

Université de Sherbrooke

Rôle des récepteurs NTS1 et NTS2 de la neurotensine dans un nouveau modèle de douleur cancéreuse osseuse

Par
Geneviève Roussy

Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de philosophia doctor (Ph.D.)
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin 2012

Membres du jury d'évaluation
Philippe Sarret, Physiologie
Louis Gendron, Physiologie
Caroline Saucier, Anatomie et biologie cellulaire
Yves St-Pierre, INRS – Institut Armand-Frappier, Université du Québec



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-93254-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-93254-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Rôle des récepteurs de la neurotensine dans un nouveau modèle de douleur cancéreuse osseuse

Par Geneviève Roussy

Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en vue de l'obtention du grade de philosophia doctor (Ph.D.) en physiologie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Un cancer du sein invasif forme préférentiellement des métastases osseuses menant à des épisodes de douleur sévère. Pour soulager cette douleur chronique, le traitement de choix actuel demeure la morphine malgré ses effets secondaires induits par la prise de fortes doses. Le développement de modèles animaux de douleur osseuse cancéreuse a permis d'améliorer notre compréhension de cette physiopathologie, favorisant ainsi la découverte de traitements alternatifs. Le premier objectif de ma thèse a donc consisté à développer un modèle animal de douleur cancéreuse mimant les douleurs induites par les métastases osseuses. Ce nouveau modèle est basé sur l'injection de cellules syngéniques du cancer du sein métastatique (E0771) au niveau du fémur de souris C57BL/6. Nous avons tout d'abord mis en évidence le caractère invasif et hormono-dépendant des E0771 *in vitro* et *in vivo* en observant l'expression de MMP9 et d'ER α . Par la suite, nous avons suivi l'impact de la croissance tumorale sur le remodelage osseux, l'évolution de la douleur et la plasticité neuronale. Dès le 11^{ème} jour post-implantation, l'analyse par Faxitron, microtomographie et IRM révèle la présence d'une destruction de la matrice osseuse. Ce remodelage osseux progresse jusqu'au jour 18 et conduit à l'apparition de douleur chez les souris porteuses d'une tumeur osseuse. Cette douleur s'est manifestée sous forme d'allodynie mécanique, de douleur ambulatoire induite par le mouvement forcé et d'inconfort ambulatoire entre les jours 11 et 18. L'apparition de cette douleur corrèle avec une augmentation de l'activité neuronale au niveau spinal. La seconde partie de ma thèse a consisté à examiner le potentiel analgésique d'agonistes neurotensinergiques injectés par voie intrathécale sur la douleur osseuse cancéreuse. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets d'agonistes des récepteurs NTS1 et NTS2 sur la douleur persistante lors du test à la formoline. Nous avons ainsi pu démontrer que l'injection de 10 μ g/kg de PD149163 (agoniste sélectif NTS1) ou de 30 μ g/kg de JMV-431 (agoniste sélectif NTS2) induisait une réponse analgésique puissante. Ces mêmes analogues ont alors été testés sur des souris sauvages ou invalidées pour NTS1 ou NTS2, développant un cancer osseux métastatique. Les résultats obtenus indiquent que NTS1 et NTS2 ne semblent pas être impliqués dans la dégradation osseuse observée suite à l'injection des E0771. En revanche, l'activation de ces récepteurs réduit la douleur induite par la tumeur osseuse. Le PD149163 diminue l'allodynie mécanique, cependant ses effets secondaires locomoteurs limitent son efficacité analgésique. Pour sa part, le JMV-431 réduit l'allodynie mécanique et la douleur induite par le mouvement forcé. Les résultats obtenus avec les souris invalidées pour NTS1 ou NTS2 corrélaient avec les résultats observés avec les agonistes ou ont démontré l'implication possible de systèmes compensatoires. En conclusion, notre modèle reflète davantage la réalité clinique par l'utilisation de cellules syngéniques du cancer du sein et le récepteur NTS2 se révèle être une cible potentielle pour soulager la douleur cancéreuse osseuse.

Mots clés : NTS1, NTS2, douleur cancéreuse osseuse, E0771, test à la formoline

TABLE DES MATIÈRES

Résumé du projet de recherche	II
Table des matières	III
Liste des tableaux	V
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	VII
Introduction	1
1. Cancer du sein.....	1
1.1 Cancer du sein <i>in situ</i> ou non invasif.....	1
1.2 Cancer du sein infiltrant ou invasif.....	2
1.2.1 Sites métastatiques.....	2
1.2.1.1 Microenvironnement osseux.....	3
2. Douleur cancéreuse osseuse.....	6
2.1 Mécanismes engendrant la douleur cancéreuse osseuse.....	7
2.1.1 Cellules de la masse tumorales.....	7
2.1.2 Ostéolyse.....	8
2.1.3 Compression nerveuse.....	9
2.2 Sensibilisation périphérique et centrale.....	10
2.3 Études <i>in vivo</i>	11
2.3.1 Modèles chez la souris.....	12
2.3.2 Modèles chez le rat.....	14
2.4 Traitement de la douleur cancéreuse osseuse.....	18
3. Test à la formaline.....	22
3.1 Méthodes d'analyse.....	22
3.2 Description du test.....	23
3.3 Changements spinaux engendrés par la formaline.....	24
4. Neurotensine.....	26

4.1 Rôles.....	26
4.1.1 Contrôle de la douleur.....	26
4.1.2 Prolifération cancéreuse.....	27
4.2 Récepteurs.....	28
4.2.1 NTS1.....	28
4.2.2 NTS2.....	32
4.2.3 NTS3.....	34
Objectifs du projet.....	36
Matériel et méthodes.....	37
Résultats.....	47
Avant-propos de l'article.....	69
Résumé de l'article.....	70
Article publié.....	71
Discussion (thèse).....	101
Conclusion.....	120
Remerciements.....	121
Références (thèse et article publié).....	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Modèles animaux de douleur cancéreuse osseuse	17
Tableau 2	Traitements actuels de la douleur cancéreuse osseuse	21
Tableau 3	Implication des récepteurs NTS1 et NTS2 en douleur aiguë, persistante et chronique	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure et innervation de l'os	3
Figure 2	Le cercle vicieux des métastases osseuses	6
Figure 3	Induction de la douleur cancéreuse osseuse	10
Figure 4	Phases du test à la formaline	23
Figure 5	Activation spinale du gène <i>C-fos</i>	25
Figure 6	Impact du SR48692 sur les effets analgésiques du PD149163 en douleur tonique	30
Figure 7	Profil des cellules cancéreuses E0771	49
Figure 8	Perte d'intégrité osseuse chez les souris atteintes d'un cancer	51
Figure 9	Atteinte osseuse progressive induite par le développement cancéreux	53
Figure 10	Analyse comportementale suite à l'injection des cellules E0771	55
Figure 11	Activité neuronale spinale induite par la douleur cancéreuse osseuse	57
Figure 12	Analgésie morphinique en douleur cancéreuse osseuse	59
Figure 13	Effets analgésiques du PD149163 et JMV-431 en douleur tonique	60
Figure 14	NTS1 et NTS2 dans la dégradation de la matrice osseuse	62
Figure 15	Effets du PD149163 et de l'inactivation de NTS1 en douleur cancéreuse osseuse	64
Figure 16	Impact du JMV-431 et de l'inactivation de NTS2 sur la douleur cancéreuse osseuse	66
Figure 17	Changement de l'activité neuronale suite à l'injection du PD149163 et du JMV-431	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
ASIC	<i>acid-sensing ion channels</i>
ARNm	ARN messenger
ATF3	<i>activating transcription factor 3</i>
CHO	cellules ovariennes d'hamster chinois
COX-2	cyclooxygénase-2
DRG	ganglion de la racine dorsale
DWB	test de distribution pondérale dynamique (<i>dynamic weight bearing</i>)
ER	récepteur oestrogénique
Gd-DTPA	<i>gadolinium diethylene tiamine pentaacetate</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
i.c.v.	intracérébroventriculaire
i.t.	intrathécale
IRM	imagerie par résonance magnétique
kDa	kilodaltons
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MMP	métalloprotéinase
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NT	neurotensine
PAG	substance grise périaqueductale
pb	paires de bases
PGE2	prostaglandine E2

PTHrP	<i>parathyroid hormone-related protein</i>
RANK	<i>receptor activator for nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>receptor activator for nuclear factor kappa B ligand</i>
ROI	région d'intérêt (<i>region of interest</i>)
s.c.	sous-cutanée
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNC	système nerveux central
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TRPA1	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid-1</i>
μ -CT	tomodensitométrie osseuse

INTRODUCTION

1. Cancer du sein

Le cancer est une pathologie touchant de près ou de loin une grande proportion de la population mondiale. Seulement au Canada, près de la moitié de la population recevra un diagnostic de cancer au cours de sa vie. Chez les femmes canadiennes, le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué actuellement. Il se classe au deuxième rang des décès causés par un cancer, tout juste après le cancer du poumon. Il a été démontré que les taux de mortalité et de survie sur cinq ans d'un individu atteint d'un cancer du sein sont associés directement au type de cancer développé. En fait, deux types de cancer du sein sont observés soit les types *in situ* et invasif (Société canadienne du cancer, 2012).

1.1 Cancer du sein *in situ* ou non invasif

Le cancer du sein *in situ* se développe et se localise exclusivement au niveau mammaire. Ce cancer se divise principalement en deux sous-types soit le carcinome canalaire et le carcinome lobulaire. Le carcinome canalaire est un cancer localisé dans les canaux galactophores mammaires conduisant le lait maternel produit par les lobules jusqu'au mamelon. Ce sous-type de cancer est le cancer du sein *in situ* le plus fréquemment diagnostiqué et représente environ 20% des nouveaux cas de cancer du sein. Pour ce qui est du carcinome lobulaire, il se concentre au niveau des lobules mammaires qui produisent le lait maternel et est seulement observé dans 5% des cas de cancer du sein *in situ* (Société canadienne du cancer, 2012, American cancer society, 2012, Mayo clinic, 2012). Les individus atteints d'un cancer du sein *in situ* obtiennent généralement un bon pronostic et un taux de survie avoisinant 100% (Mayo clinic, 2012).

1.2 Cancer du sein infiltrant ou invasif

Le cancer du sein infiltrant est le type le plus diagnostiqué au niveau mammaire et possède la capacité d'envahir tous les tissus de l'individu suite à l'atteinte du tissu mammaire. Trois sous-types de cancer infiltrant sont connus soit le carcinome canalaire (85% des cas), le carcinome lobulaire (10% des cas) et les carcinomes rares (5% des cas). Le dernier sous-type, les carcinomes rares, regroupe des cas de cancer du sein infiltrant tels que la maladie de Paget du sein et le carcinome tubulaire (Société canadienne du cancer, 2012, American cancer society, 2012, Mayo clinic, 2012). Les individus atteints d'un cancer du sein infiltrant reçoivent habituellement un mauvais pronostic et ont un taux de survie sur cinq ans en dessous de 20% selon le site métastatique atteint (Mayo clinic, 2012) (Coleman et Rubens, 1987). En effet, la survie de l'individu chute à trois mois lorsqu'il y a présence de métastases au niveau du foie, tandis qu'en présence de métastases osseuses, la survie est d'environ 20 mois (Coleman et Rubens, 1987; Solomayer *et al.*, 2000).

1.2.1 Sites métastatiques

Le cancer du sein infiltrant peut provoquer l'apparition de métastases localement au niveau des ganglions lymphatiques ainsi qu'au niveau de trois principaux sites distants soit les poumons, le foie et les os. Des études effectuées sur des patients décédés des suites d'un cancer du sein décrivent qu'environ 30% des patients avaient des métastases pulmonaires ou hépatiques tandis qu'environ 70% de ceux-ci avaient des métastases au niveau osseux (Cifuentes et Pickren, 1979; Coleman et Rubens, 1987; Domchek *et al.*, 2000; Plunkett *et al.*, 2000; Weiss, 1992). Les métastases au niveau osseux, site préférentiel des métastases du cancer du sein invasif, atteignent principalement trois structures soit les os longs, les vertèbres et les os du bassin (Rubens, 1998).

1.2.1.1 Microenvironnement osseux

Les métastases osseuses se développent davantage au niveau de la métaphyse comparativement à l'épiphyse ou à la diaphyse (Figure 1) (Bussard *et al.*, 2008; Mastro *et al.*, 2003). Le microenvironnement osseux de la métaphyse possède donc quelques caractéristiques favorisant l'ancrage et le développement de métastases comparativement aux autres parties formant l'os.

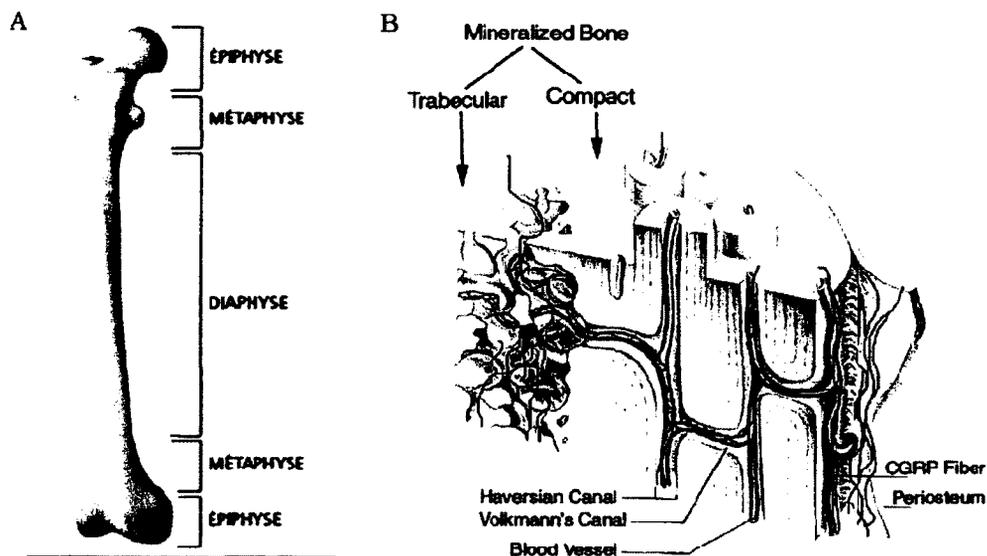


Figure 1. Structure et innervation de l'os.

A) L'os se divise en trois sections soit les épiphyses (extrémités), la diaphyse (centre) et les métaphyses (sous la plaque de croissance). B) L'os est irrigué par des vaisseaux sanguins et fortement innervé par des fibres afférentes primaires et ce particulièrement au niveau de la métaphyse.

Figures provenant de A) www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-os.html et B) (Mach *et al.*, 2002)

Une des caractéristiques de la métaphyse est que 90% du flot sanguin osseux l'irrigue et que ce flot est environ 10% plus lent que dans les autres structures osseuses (Mazo et von Andrian, 1999; Welch *et al.*, 2003). Cette particularité permet d'augmenter le temps de contact entre les cellules cancéreuses au niveau sanguin et le microenvironnement osseux

de la métaphyse favorisant ainsi l'ancrage des cellules cancéreuses et la formation de métastases. Une autre caractéristique de la métaphyse est qu'elle possède un haut taux de molécules d'adhésion (Mazo *et al.*, 1998; Mazo et von Andrian, 1999; Welch *et al.*, 2003). Ces molécules sont essentielles pour l'ancrage des cellules cancéreuses, ce qui facilite l'apparition de métastases osseuses. Une dernière caractéristique de la métaphyse est qu'elle est principalement constituée d'os trabéculaire (os spongieux), ayant la particularité d'être métaboliquement actif (Bussard *et al.*, 2008; Mastro *et al.*, 2003). La résorption osseuse, effectuée par les ostéoclastes, et la reconstruction osseuse, réalisée par les ostéoblastes, se font rapidement et continuellement au niveau de l'os trabéculaire. Cette particularité permet, par l'activité ostéoclastique, la libération de facteurs de croissance de la matrice osseuse tels que l'*insulin growth factor* et le *transforming growth factor- β* (TGF- β). Ces facteurs de croissance sont les plus retrouvés dans la structure osseuse et ils possèdent la capacité d'agir sur la croissance des cellules cancéreuses du cancer du sein (Hauschka *et al.*, 1986; Yoneda *et al.*, 1994). En plus de la libération de facteurs de croissance, certains agents chimioattractants sont libérés par les ostéoblastes et les ostéoclastes tels que la sialoprotéine, l'ostéopontine, l'ostéonectine et les chimiokines permettant ainsi le recrutement de cellules cancéreuses mammaires et la formation de métastases au niveau osseux (Bussard *et al.*, 2008; Mastro *et al.*, 2003).

1.2.1.1.1 Cercle vicieux

Lorsque les cellules du cancer du sein parviennent à l'os, un débalancement entre l'activité des ostéoclastes et celle des ostéoblastes survient et s'amplifie en fonction de la progression du cancer. Ce débalancement est de type ostéolytique dans 85% des cas et de type ostéoblastique ou mixte dans 15% des cas (Kozlow et Guise, 2005).

Dès leur arrivée dans le microenvironnement osseux, les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs agissant directement ou indirectement sur l'ostéoclastogénèse. Par exemple, le *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) stimule les précurseurs ostéoclastiques pour favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures tandis que le *parathyroid hormone related peptide* (PTHrP) se dirige vers les ostéoblastes (Carlsten,

2005; Kozlow et Guise, 2005) (Figure 2). La liaison de PTHrP aux ostéoblastes entraîne la libération d'un second facteur, *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL), qui stimule l'ostéoclastogenèse en se liant sur son récepteur, RANK, exprimé par les précurseurs ostéoclastiques (Kozlow et Guise, 2005). D'autres facteurs sécrétés par les cellules cancéreuses et les ostéoblastes peuvent influencer positivement l'ostéoclastogenèse soit directement ou indirectement. Ces facteurs sont les interleukines 1, 8 et 11; la chimiokine MCP-1; le *vascular endothelial growth factor*, le TGF- β ; le *platelet-derived growth factor* et la prostaglandine E2 (PGE2) (Aldridge *et al.*, 2005; Bendre *et al.*, 2003; Bussard *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2003; Kinder *et al.*, 2008; Larkins *et al.*, 2006; Mercer et Mastro, 2005; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2008; Troen, 2003). L'augmentation de l'activité ostéoclastique mène à une dégradation de la matrice osseuse permettant la libération de différents facteurs emprisonnés dans celle-ci tels que des facteurs de croissance et le calcium. L'*insulin growth factor*, le facteur de croissance le plus abondant dans l'os, stimule la croissance des cellules cancéreuses présentes dans le microenvironnement osseux (Yoneda et Hiraga, 2005). Cette augmentation de la croissance cellulaire entraîne une hausse de la libération des facteurs stimulant l'ostéoclastogenèse tels que le GM-CSF et le PTHrP. De plus, le calcium libéré de la matrice osseuse lie un récepteur, le *calcium sensing receptor*, exprimé par les cellules cancéreuses menant ainsi à la transcription de différents gènes dont celui du PTHrP (Sanders *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2007). Cette transcription de gènes au niveau des cellules cancéreuses est stimulée par un autre facteur soit le TGF- β qui, en plus d'être relâché par les ostéoblastes et les cellules cancéreuses, est libéré de la matrice osseuse lors de sa dégradation (Buijs *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2003). L'augmentation des facteurs stimulant directement ou indirectement les ostéoclastes favorise donc une dégradation plus importante de la matrice osseuse et la libération des facteurs s'y retrouvant et ainsi de suite. Il se crée donc un phénomène reconnu comme étant un cercle vicieux où la progression cancéreuse et la dégradation osseuse évoluent parallèlement. L'établissement du cercle vicieux et de son amplification mène inévitablement à l'apparition de différents événements tels que fractures, hypercalcémie, compression nerveuse et douleur (Coleman, 1997).

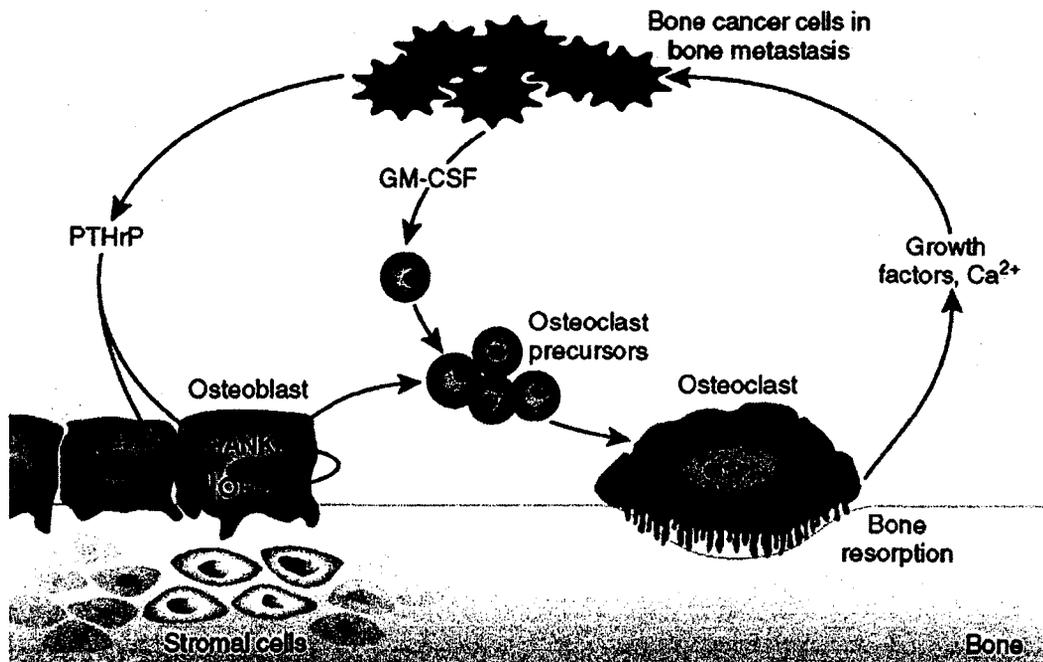


Figure 2. Le cercle vicieux des métastases osseuses.

L'interaction entre les cellules cancéreuses, les ostéoblastes et les ostéoclastes mène à l'établissement d'un cercle vicieux où la prolifération tumorale et la dégradation osseuse sont stimulées de façon continue.

PTHrP : *parathyroid hormone related peptide*, GM-CSF : *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, RANKL : *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, OPG : ostéoprotégerine

Figure tirée de (Roodman, 2007)

2. Douleur cancéreuse osseuse

La douleur cancéreuse osseuse possède des composantes inflammatoires et neuropathiques tout en ayant ses propres caractéristiques lui conférant ainsi son caractère unique et complexe (Honore *et al.*, 2000b ; Luger *et al.*, 2005 ; Peters *et al.*, 2005). La chronicité de la douleur cancéreuse engendre non seulement des changements neurochimiques au niveau spinal, mais aussi une sensibilisation périphérique et centrale.

2.1 Mécanismes engendrant la douleur cancéreuse osseuse

Au niveau osseux, des fibres afférentes primaires A δ et C, qui transmettent l'information douloureuse à partir de la périphérie vers la moelle épinière et les centres supérieurs, sont retrouvées dans la partie minéralisée, le périoste et la moelle osseuse (Mach *et al.*, 2002) (Figure 1). L'atteinte de ces fibres, par des stimuli mécaniques (ex : distension du périoste), chimiques (ex : acidification du milieu par la libération de protons via l'activité ostéoclastique) ou électriques (ex : hyperexcitabilité des fibres afférentes primaires par la compression nerveuse), engendre une douleur s'accroissant selon la progression cancéreuse. En effet, de 30 à 50% des patients atteints d'un cancer présentent une douleur de modérée à sévère tandis que lorsque le cancer est métastatique et/ou avancé, une douleur sévère est ressentie dans 75-95% des cas (Meuser *et al.*, 2001 ; Portenoy et Lesage, 1999). La douleur cancéreuse osseuse se manifeste de façon continue et, avec la progression tumorale, elle s'ajoute d'épisodes de douleur spontanée et de douleur induite par le mouvement ambulateur ou forcé (King et Porreca, 2010). Cette douleur peut être engendrée par trois éléments soit les cellules de la masse tumorale, l'ostéolyse et la compression nerveuse et ischémique (Clines et Guise, 2008).

2.1.1 Cellules de la masse tumorale

En plus de libérer des facteurs favorisant directement ou indirectement l'ostéoclastogenèse, les cellules cancéreuses formant la masse tumorale libèrent des facteurs pro-nociceptifs et pro-inflammatoires (Figure 3). Ces facteurs sont principalement le *nerve growth factor* (NGF), l'endothéline, la PGE2, l'interleukine-1 β et le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) qui vont activer respectivement les récepteurs TrkA, ET_AR, EP4, IL-1R et TNFR1 situés sur les fibres afférentes primaires A δ et/ou C (Bloom *et al.*, 2011 ; de Oliveira *et al.*, 2011; Isono *et al.*, 2011 ; Peters *et al.*, 2004 ; Sevcik *et al.*, 2004).

La masse tumorale présente au niveau osseux n'est pas uniquement composée de cellules cancéreuses, mais contient aussi des cellules du système immunitaire comme des

macrophages, des mastocytes, des lymphocytes T et des neutrophiles. Ces cellules immunitaires libèrent du NGF, de la PGE₂, du TNF- α , de l'endothéline, du TGF- β , du *platelet-derived growth factor* et des interleukines (Davar, 2001 ; Kundu *et al.*, 2001 ; Nadler *et al.*, 2000 ; Radinsky, 1991; Watkins *et al.*, 1995). Cette implication du système immunitaire dans l'induction de la douleur cancéreuse osseuse constitue une composante de l'aspect inflammatoire de cette douleur unique.

2.1.2 Ostéolyse

Tel que mentionné précédemment, la très grande majorité des cancers du sein métastatiques sont de type ostéolytique. La dégradation osseuse provoque non seulement la libération de facteurs de croissance de la matrice osseuse, mais aussi l'induction de douleur via l'activité ostéoclastique. Pour enclencher le processus de dégradation osseuse, les ostéoclastes se lient à la surface osseuse via leur interaction avec des intégrines (Teitelbaum, 2000). Par la suite, les ostéoclastes produisent et sécrètent des ions H⁺ dans le compartiment nouvellement formé pour solubiliser les sels et déminéraliser les composantes organiques de la matrice osseuse (Rousselle et Heymann, 2002; Teitelbaum, 2000). Pour maintenir un pH homéostatique au niveau du cytoplasme des ostéoclastes et ainsi éviter le dysfonctionnement ostéoclastiques, des ions H⁺ sont sécrétés dans le microenvironnement osseux via l'antiport Na⁺/H⁺ (Rousselle et Heymann, 2002). Cette augmentation du pH dans le microenvironnement osseux permet donc l'activation des canaux sensibles à l'acidité, tels que les canaux *acid-sensing ion channels* (ASIC) et *transient receptor potential vanilloid-1* (TRPV1), qui sont exprimés par les fibres afférentes primaires. La hausse de l'activité ostéoclastique augmente donc l'acidité au niveau osseux et par conséquent, la douleur cancéreuse osseuse.

2.1.3 Compression nerveuse

La masse tumorale qui se forme suite à l'implantation des métastases osseuses occupe de plus en plus d'espace dans le microenvironnement osseux au détriment de la matrice osseuse. Ce resserrement osseux provoque inévitablement la compression des fibres afférentes primaires présentes au sein de l'os, directement ou indirectement via une compression ischémique. La compression des vaisseaux sanguins présents au niveau de l'os par la tumeur peut contraindre les fibres afférentes primaires adjacentes aux vaisseaux sanguins atteints. Que ce soit une compression directe ou indirecte, il se produit alors une altération ou destruction des fibres afférentes primaires ce qui engendre de la douleur via une activité électrique anormale au niveau des nocicepteurs qui se fait, entre autres, par l'activation des canaux Nav1.8 (Jarvis *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2010). De plus, les canaux ASIC2, *transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1* (TRPA1) et TRPV4 exprimés par les fibres afférentes primaires sont activés puisqu'ils sont sensibles aux stimuli mécaniques (Caspani *et al.*, 2009 ; Levine et Alessandri-Haber, 2007 ; Lingueglia *et al.*, 1997 ; Staaf *et al.*, 2009). L'activation des fibres afférentes primaires de façon mécanique constitue donc une composante de l'aspect neuropathique de la douleur cancéreuse osseuse.

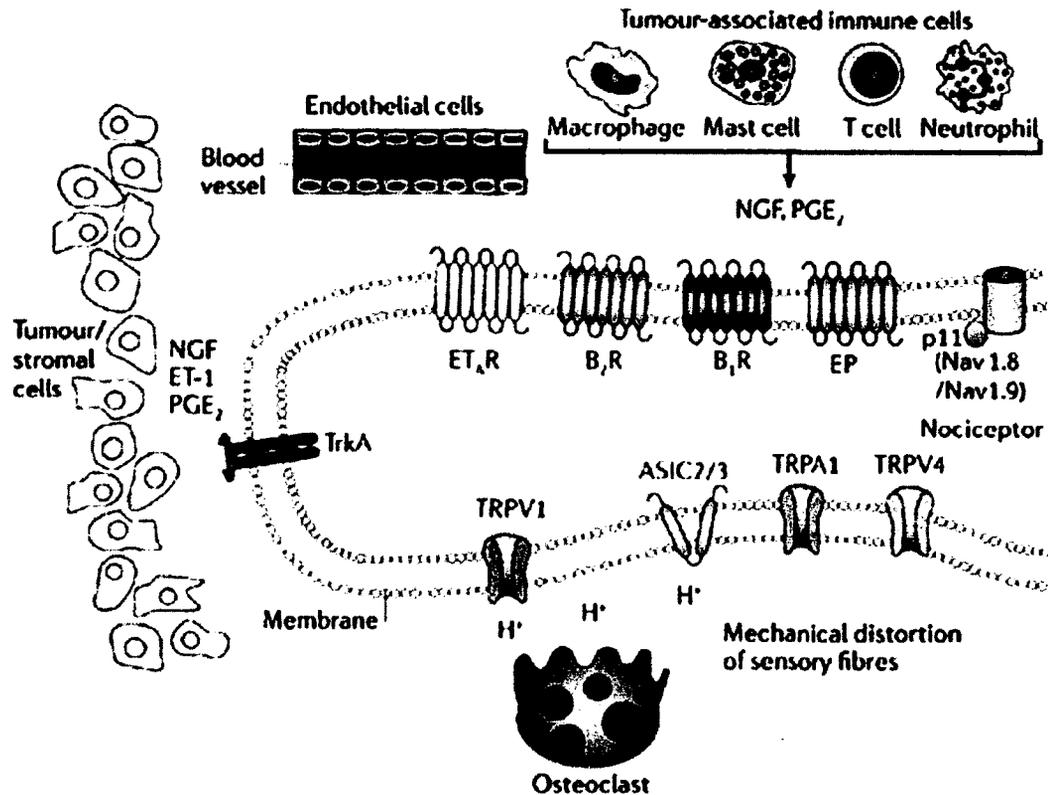


Figure 3. Induction de la douleur cancéreuse osseuse

Trois mécanismes sont responsables de l'apparition de cette douleur soit les cellules de la masse tumorale, l'ostéolyse et la compression nerveuse.

Figure tirée de (Mantyh, 2006)

2.2 Sensibilisation périphérique et centrale

La croissance constante de la masse tumorale dans le microenvironnement osseux, accompagnée par le recrutement de cellules telles que les macrophages, des mastocytes, des lymphocytes T et des neutrophiles, engendre une chronicité périphérique et centrale de la douleur cancéreuse osseuse. Cette chronicité douloureuse est tout d'abord observée en périphérie où les fibres afférentes primaires A δ et C sont hautement sollicitées par des facteurs tels que les interleukines, l'endothéline-1 et PGE₂ qui sont relâchés par les cellules qui composent la masse tumorale (Chen *et al.*, 1999; Hamamoto *et al.*, 2008; Honore *et al.*, 2000b; Kawasaki *et al.*, 2008). La sur-stimulation des fibres A δ et C favorise alors

l'augmentation de l'activité spontanée de ces fibres. Cette hyperexcitabilité des fibres afférentes primaires se traduit par l'apparition d'hyperalgésie, d'allodynie et de changements neurochimiques spinaux (Cain *et al.*, 2001; Khasabov *et al.*, 2007). Une augmentation de l'activation du gène *C-fos*, de l'expression de la dynorphine ainsi qu'une astrogliose sont les changements neurochimiques survenant au niveau spinal lors d'un cancer osseux induit chez la souris (Honore *et al.*, 2000b). Ces événements spinaux et l'activité spontanée des fibres afférentes, qui se projettent dans différentes lamina de la moelle épinière, mènent à la sensibilisation centrale. Une augmentation de la transmission excitatrice entre les segments lombaires de la moelle épinière et une diminution du seuil de stimulation des neurones à large gamme dynamique, neurones transmettant l'information de la moelle épinière aux centres supérieurs, sont alors observées (Khasabov *et al.*, 2007; Yanagisawa *et al.*, 2010). De plus, les astrocytes présents dans la moelle épinière participent à la sensibilisation neuronale en libérant des facteurs dont des interleukines et du TNF- α (Gordon-Williams et Dickenson, 2007). Le système descendant de contrôle de la douleur peut lui aussi participer à la sensibilisation centrale via la libération de sérotonine et l'activation du récepteur 5-HT₃ au niveau spinal (Donovan-Rodriguez *et al.*, 2006). Il est à noter que les fibres A β , des mécanorécepteurs, ne semblent pas intervenir dans les mécanismes de sensibilisation périphérique et centrale observés en douleur cancéreuse osseuse malgré leur implication dans les douleurs chroniques neuropathique et inflammatoire (Kohno *et al.*, 2003; Okamoto *et al.*, 2001; Yanagisawa *et al.*, 2010). En douleur cancéreuse osseuse, les fibres A δ et C participent donc à la sensibilisation périphérique qui mène à des changements centraux et par le fait même à la sensibilisation centrale.

2.3 Études *in vivo*

Les études *in vivo* permettent d'obtenir des informations pertinentes sur les mécanismes qui induisent la douleur chez un organisme où plusieurs systèmes interagissent, tel qu'observé chez l'humain. De plus, elles nous permettent d'évaluer des traitements ayant un potentiel thérapeutique avant de passer aux études cliniques. Des modèles animaux ont donc été

développés pour étudier la douleur cancéreuse osseuse chez la souris et le rat, car ces rongeurs ont la particularité de présenter une réponse douloureuse qui peut être transposée à celle ressentie chez l'humain (Mogil *et al.*, 2010). En plus, ces rongeurs permettent d'évaluer les mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie, entre autres en utilisant des outils tels que les animaux transgéniques et les siRNA (Dore-Savard *et al.*, 2010; Lafrance *et al.*, 2010; Maeno *et al.*, 2004; Roussy *et al.*, 2010).

2.3.1 Modèles chez la souris

Le premier modèle développé pour étudier la douleur cancéreuse osseuse chez la souris, et qui est largement utilisé actuellement, consiste à injecter des cellules NCTC 2472 au niveau fémoral chez des souris mâles de souche C3H (Tableau 1) (Clohisy *et al.*, 1996; Honore *et al.*, 2000b; Schwei *et al.*, 1999). Les cellules NCTC 2472 issues de souris de souche C3H sont dérivées d'une tumeur spontanée du tissu conjonctif, lesquelles forment un fibrosarcome (Clohisy *et al.*, 1996). Suite à l'injection des cellules NCTC 2472, de la dégradation osseuse, engendrée par une augmentation de l'activité ostéoclastique, a été observée à partir du sixième jour (El Mouedden et Meert, 2005, 2007; Hald *et al.*, 2009a; Halvorson *et al.*, 2008; Honore *et al.*, 2000a; King *et al.*, 2007; Lozano-Ondoua *et al.*, 2010; Luger *et al.*, 2002; Sabino *et al.*, 2003). Cette dégradation osseuse entraîne l'apparition d'allodynie mécanique (douleur engendrée par un stimulus mécanique normalement non douloureux) à partir des jours cinq à 14 suivant l'injection fémorale (Hald *et al.*, 2009a; Hald *et al.*, 2009b; Honore et Mantyh, 2000; King *et al.*, 2007; Svensson *et al.*, 2008). En plus de l'allodynie mécanique, des douleurs ambulatoires spontanées et forcées sont observées dans ce modèle à partir des jours sept et 13 respectivement (Dudek *et al.*, 2008; El Mouedden et Meert, 2005, 2007; Hald *et al.*, 2009a; Honore et Mantyh, 2000; King *et al.*, 2007; Sabino *et al.*, 2003; Zwolak *et al.*, 2008b). Des études neurochimiques au niveau spinal ont aussi été réalisées 21 jours après l'induction de la douleur cancéreuse osseuse caractérisant ainsi les aspects inflammatoire (augmentation de l'expression de la dynorphine) et neuropathique (astrogliose) de celle-ci (Hald *et al.*, 2009b; Halvorson *et al.*, 2008; Honore *et al.*, 2000b; Luger *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2004;

Sabino *et al.*, 2003; Schwei *et al.*, 1999). Toujours au niveau spinal, une augmentation de l'activité neuronale, via l'activation du gène *C-Fos*, a été notée dans les lamina superficielles (I-III), mais surtout dans les lamina plus profondes (V-VI) 21 jours après l'injection des cellules NCTC 2472 (Halvorson *et al.*, 2008; Luger *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2004; Sabino *et al.*, 2003; Schwei *et al.*, 1999). Une augmentation de l'activité neuronale a aussi été détectée au niveau des ganglions de la racine dorsale (DRGs) de la moelle épinière par l'activation du gène *ATF3* au 12^e ou 14^e jours suivant l'injection des cellules tumorales (King *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2005).

Après la parution du modèle décrit par Schwei *et al.*, 1999, deux modèles dérivant de celui-ci ont fait leur apparition. La différence se situe principalement au niveau du site d'injection des cellules tumorales, le fémur ayant été remplacé par le tibia ou le talon (Tableau 1) (Baamonde *et al.*, 2005; Cain *et al.*, 2001; Khasabov *et al.*, 2007; Khasabova *et al.*, 2011; Khasabova *et al.*, 2008; Menendez *et al.*, 2003; Wacnik *et al.*, 2001). Suite à l'injection des cellules NCTC 2472 au niveau du tibia, de l'hyperalgésie mécanique a été mesurée après quatre à six jours, mais aussi de l'hyperalgésie thermique dès le jour dix (Menendez *et al.*, 2003; Wacnik *et al.*, 2001). Les cellules cancéreuses NCTC2472 injectées dans et autour du talon ont pour leur part induit de l'hyperalgésie mécanique dès le jour six ou sept et de la douleur ambulatoire spontanée après sept jours (Cain *et al.*, 2001; Khasabov *et al.*, 2007; Potenzieri *et al.*, 2008).

Un autre modèle dérivé de celui publié par Schwei a été développé chez des souris de souche C57Bl/6 recevant des cellules MC57G au niveau du fémur (Tableau 1) (Geis *et al.*, 2010). Les cellules MC57G proviennent d'un fibrosarcome développé chez des souris de souche C57Bl/6. Dans ce modèle, de l'allodynie mécanique, de la douleur ambulatoire spontanée et de la douleur ambulatoire forcée ont été observées dès le jour 11, quatre et huit respectivement suite à l'injection des cellules cancéreuses. Ces comportements douloureux résultent de la destruction osseuse engendrée par l'augmentation des ostéoclastes activés observée au jour 18. De plus, une augmentation de l'activation des astrocytes spinaux a été notée 18 jours après l'injection des cellules cancéreuses (Geis *et al.*, 2010).

D'autres laboratoires ont développé un modèle qui consiste à injecter des cellules 4T1 dans le fémur de souris saines de souche BALB/c ou des souris immunodéficientes de souche C3H (Tableau 1) (Dudek *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2011; Zwolak *et al.*, 2008a; Zwolak *et*

al., 2008b). Les cellules 4T1 proviennent d'un cancer du sein hautement métastatique de souris de souche BALB/c (Aslakson et Miller, 1992). En général, les études utilisant ces cellules n'évaluent aucunement la douleur cancéreuse développée suite à l'induction du cancer osseux. Par contre, il a été démontré que la douleur ambulatoire spontanée et la douleur induite par le mouvement forcé sont augmentées dès le 13^e et le 14^e jour post-injection au niveau du canal médullaire fémoral chez les souris femelles immunodéficientes et saines respectivement (Dudek *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2011; Zwolak *et al.*, 2008a; Zwolak *et al.*, 2008b).

Les souris immunodéficientes ont aussi été utilisées pour développer un modèle consistant à injecter des cellules du cancer du sein métastatique au niveau cardiaque ou osseux (Bloom *et al.*, 2011; Canon *et al.*, 2008; Chanda *et al.*, 2008; Hamaguchi *et al.*, 2011; Strube *et al.*, 2009; van Beek *et al.*, 2009). Dans la majorité des études utilisant ces modèles, aucune évaluation de la douleur n'a été effectuée. Seul Bloom et ses collaborateurs ont noté des comportements douloureux lors de l'ambulation spontanée. Ils ont réalisé leur étude chez des femelles immunosupprimées ayant reçu une injection de cellules humaines MDA-MD-231 au niveau fémoral (Tableau 1) (Bloom *et al.*, 2011). Dans ce modèle, où des cellules humaines du cancer du sein métastatique sont injectées, la douleur spontanée et la destruction osseuse apparaissent significativement dès le 28^e jour post-injection. Ces observations corrélerent avec le bourgeonnement des fibres afférentes primaires A δ et C exprimant le NGF.

2.3.2 Modèles chez le rat

Chez le rat, le modèle le plus utilisé à ce jour consiste à injecter des cellules MRMT-1 chez des rats femelles de souche Sprague-Dawley au niveau du tibia (Tableau 1) (Donovan-Rodriguez *et al.*, 2005; Donovan-Rodriguez *et al.*, 2006; Medhurst *et al.*, 2002; Nagae *et al.*, 2007; Urch *et al.*, 2005). Les cellules MRMT-1 proviennent d'un cancer du sein de rats de souche Sprague-Dawley (Medhurst *et al.*, 2002). Dans ce modèle, une destruction osseuse peut être observée dès le septième jour suivant l'injection de cellules MRMT-1 ce qui est confirmé par l'augmentation du nombre d'ostéoclastes activés présents au site

d'injection au jour 21 post-injection (Medhurst *et al.*, 2002; Nagae *et al.*, 2007). Cette résorption osseuse mène à l'apparition d'allodynie mécanique et thermique à partir du jour 11 (Donovan-Rodriguez *et al.*, 2005; Donovan-Rodriguez *et al.*, 2006; Medhurst *et al.*, 2002; Urch *et al.*, 2005). En plus de l'allodynie, de l'hyperalgésie thermique et mécanique ont été mesurées dans ce modèle dès les jours dix et 14 respectivement (Medhurst *et al.*, 2002; Nagae *et al.*, 2007). De plus, la douleur spontanée, se manifestant par le poids posé sur chaque patte, et la douleur ambulatoire forcée sont observées dès le jour 11 post-chirurgie (Donovan-Rodriguez *et al.*, 2006; Medhurst *et al.*, 2002; Urch *et al.*, 2005). Au niveau spinal, une augmentation du marquage astrocytaire a été notée au jour 17 en plus d'une augmentation de l'activité neuronale au jour 14 chez les animaux cancéreux (Medhurst *et al.*, 2002; Nagae *et al.*, 2007). Cette activité neuronale, déterminée par l'expression du gène *C-fos*, a été observée dans les lamina I-II et V-VII (Nagae *et al.*, 2007).

Récemment, le modèle de Medhurst a été modifié au niveau du site d'injection des cellules MRMT-1 et du genre des animaux utilisés (Tableau 1) (Dore-Savard *et al.*, 2010; Otis *et al.*, 2011). Dans ce nouveau modèle, le fémur a été priorisé au lieu du tibia en tant que site d'injection, car le fémur est l'os le plus fréquemment atteint lors d'un cancer du sein métastatique humain (Coleman, 2006). Des résultats similaires au modèle publié par Medhurst ont été obtenus au niveau des comportements douloureux. Chez les animaux cancéreux, de l'allodynie mécanique a été mesurée dès le jour sept, de l'hyperalgésie mécanique au jour 18 et de la douleur ambulatoire forcée a été observée à partir du 15^e jour (Dore-Savard *et al.*, 2010; Otis *et al.*, 2011). Ces comportements corrént avec la présence de destruction osseuse au jour 14 et l'augmentation de l'activité ostéoclastique au site d'injection au jour 21 (Dore-Savard *et al.*, 2010). Dans la moelle épinière, une augmentation des microglies et de l'activité neuronale a été observée au jour 14 chez les animaux cancéreux. Cette activité neuronale, déterminée par l'activation du gène *C-fos*, a été révélée dans les lamina V-VI et VII-VIII. De plus, l'augmentation de l'activité neuronale a aussi été détectée dans les ganglions de la racine dorsale à l'aide de l'expression du gène *ATF3* au jour 14 (Dore-Savard *et al.*, 2010).

Un autre modèle a été développé consistant cette fois à injecter les cellules Walker 256 au niveau du tibia de rats de souche Wistar (Tableau 1) (Cao *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011;

Miao *et al.*, 2010). Les cellules Walker 256 proviennent du cancer du sein de rats de souche Wistar. Dans ce modèle, une destruction osseuse a été observée au jour 19 (Cao *et al.*, 2010). Des comportements douloureux ont découlé de cette atteinte osseuse soit de l'allodynie mécanique dès le jour six, de la douleur ambulatoire spontanée à partir du jour 10 et de la douleur ambulatoire forcée dès le jour 14 (Cao *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2010). Au niveau spinal, une augmentation des marqueurs inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α a été détectée chez les animaux cancéreux en plus d'une astrogliose (Cao *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011).

	Souche	Genre	Type cellulaire	Origine des cellules	Site d'injection	Nombre de cellules injectées	Volume injecté (µL)	Références	
Souris	C3H/HeJ	Mâles	NCTC2472	Fibrosarcome	Fémur	1×10^5	20	Schwei <i>et al.</i> (1999) J Neurosci. Honore <i>et al.</i> (2000) Neurosci	
	C3H/HeJ	Mâles	NCTC2472	Fibrosarcome	Tibia	1×10^5	5 ou 20	Baamonde <i>et al.</i> (2005) NSAP. Menendez <i>et al.</i> (2003) Brain Res	
	C3H/HeNcr	Mâles	NCTC2472	Fibrosarcome	Talon	2×10^5	10	Khasabov <i>et al.</i> (2007) Brain Res. Khasabov <i>et al.</i> (2008) J Neurosci et (2011) Pharmacol Res. Cain <i>et al.</i> (2001) J Neurosci. Potenziari <i>et al.</i> (2008) Brain Res. Wacnik <i>et al.</i> (2001) J Neurosci	
	C3H/HeJ	Mâles	NCTC2472	Fibrosarcome	Fémur	2.5×10^4	5	Lozano-Ondoua <i>et al.</i> (2010) Life Sci	
	C57BL/6	Mâles	MC57G	Fibrosarcome	Fémur	1×10^6	20	Geis <i>et al.</i> (2010) Neurosci	
	C3H/Scid	Femelles	4T1	Cancer du sein métastatique	Fémur	1×10^4	?	Zwolak <i>et al.</i> (2008) Eur J Cancer. Dudek <i>et al.</i> (2008) Invest New Drugs	
	BALB/cJ	?	4T1	Cancer du sein métastatique	Fémur	1×10^4	10	Hansen <i>et al.</i> (2011) Pain	
	"athymic nude"	Femelles	MDA-MB-231-BO	Cancer du sein métastatique	Fémur	1×10^5	20	Bloom <i>et al.</i> (2011) J Pain	
	Rat	Sprague-Dawley	Femelles ou mâles	MRMT-1	Cancer du sein	Tibia	3×10^3 ou 1×10^6	3, 10 ou 20	Medhurst <i>et al.</i> (2002) Pain. Nagae <i>et al.</i> (2007) J Bone Miner Metab. Donovan-Rodriguez <i>et al.</i> (2005) Anesthesiology et (2006) Neurosci Lett, Urch <i>et al.</i> (2005) J Pain
		Sprague-Dawley	Mâles	MRMT-1	Cancer du sein	Fémur	3×10^4	20	Dore-Savard <i>et al.</i> (2010) PLoS One. Otis <i>et al.</i> (2011) Neurosci
Wistar		Femelles	Walker 256	Cancer du sein	Tibia	4×10^3 , 4×10^4 ou 2×10^5	4 ou 10	Cao <i>et al.</i> (2010) Brain Res. Miao <i>et al.</i> (2010) BMC Cancer. Dong <i>et al.</i> (2011) Neurosci Lett	

Tableau 1. Modèles animaux de douleur cancéreuse osseuse.

Résumé des modèles de douleur cancéreuse osseuse actuellement connus et développés chez la souris et le rat. Plusieurs modèles ont été développés, en particulier chez la souris. Le fémur semble être le site de choix pour l'injection de cellules cancéreuses et l'induction d'un cancer osseux.

Il est à noter que l'œstrogène peut influencer la perception douloureuse et la croissance tumorale (Aloisi et Bonifazi, 2006; Cairns et Gazerani, 2009; Dickenson et Sullivan, 1987; Lippman et Dickson, 1989). La majorité des modèles animaux de douleur cancéreuse osseuse sont donc réalisés chez le mâle dans le but d'éviter toutes influences incontrôlables ou externes sur la croissance tumorale lors de la caractérisation des modèles. Par ailleurs, pour un même modèle, les résultats obtenus peuvent différer légèrement dû au fait que le nombre de cellules cancéreuses injectées peut varier d'un laboratoire à un autre. De plus, lors de la chirurgie, certains laboratoires procèdent à une arthrotomie (atteinte/ouverture de l'articulation) ce qui peut induire l'apparition d'un biais dans l'évaluation du comportement douloureux (Medhurst *et al.*, 2002; Schwei *et al.*, 1999). Malgré les différences observées, les modèles décrits permettent l'analyse de traitements potentiels contre la douleur cancéreuse osseuse. Suite aux résultats obtenus, ces traitements poursuivent ou non leur route vers différents tests cliniques qui sont réalisés chez les humains.

2.4 Traitement de la douleur cancéreuse osseuse

Pour être efficace, le traitement de la douleur cancéreuse osseuse doit cibler la douleur déjà ressentie et/ou les éléments pouvant l'induire tels que les facteurs libérés par les cellules formant la masse tumorale, l'ostéolyse et la croissance tumorale. Actuellement, le traitement se présente sous forme de monothérapie ou de multi-thérapie comprenant les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS), les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2), la chimiothérapie, la radiothérapie, les traitements hormonaux, l'anticorps anti-RANKL, les bisphosphonates et/ou les opioïdes (Tableau 2) (Goblirsch *et al.*, 2005; Weilbaecher *et al.*, 2011).

Les AINS et les inhibiteurs de la COX-2 constituent la première ligne de traitement contre la douleur faible à modérée. Ils ont l'avantage de ne créer aucune tolérance ou dépendance, mais ils peuvent induire des effets secondaires rénaux et gastrointestinaux (Pantano *et al.*, 2011). Il faut noter que les inhibiteurs de la COX-2 ont la même efficacité que les AINS. Par contre, ils provoquent moins d'effets au niveau gastrointestinal que les AINS, mais des

risques de complications cardiovasculaires leurs sont associés (Davies, 2004; Goblirsch *et al.*, 2005).

La chimiothérapie et la radiothérapie sont des traitements agressifs efficaces contre la croissance anarchique des cellules tumorales. Néanmoins, ils sont responsables d'effets indésirables tels que la fatigue et la nausée (Mantyh *et al.*, 2002). Ces thérapies agissent indirectement sur la douleur via la diminution de la croissance tumorale, résultant ainsi en une diminution de la relâche de facteurs pouvant activer les fibres afférentes primaires présentes dans l'os.

D'autres traitements agissent de façon indirecte sur la douleur en limitant la relâche de facteurs pro-nociceptifs par les cellules cancéreuses. Il s'agit de traitements hormonaux tels que les antagonistes du récepteur oestrogénique- α (ER α) et les inhibiteurs de l'aromatase, enzyme impliquée dans la synthèse de l'oestrogène. Ils ciblent les cellules cancéreuses exprimant les récepteurs oestrogéniques pour diminuer la croissance tumorale (Dickenson et Sullivan, 1987; Lippman et Dickson, 1989). Ce traitement est donc efficace contre les cancers du sein hormono-dépendants représentant environ 70% des cancers du sein diagnostiqués (Dunnwald *et al.*, 2007). Les effets indésirables observés suite à la prise d'une médication anti-oestrogénique incluent une augmentation des risques de cancer de l'endomètre, des risques de thrombose et des troubles de l'humeur (Monnier, 2007).

Les bisphosphonates et les anticorps anti-RANKL diminuent la résorption osseuse et par conséquent la douleur. Cependant, 30 à 50% des patients traités avec ces médicaments développent tout de même de nouvelles métastases osseuses et des complications squelettiques tout en ayant une progression de leur cancer (Jensen *et al.*, 2011; Roodman, 2004). De plus, les bisphosphonates provoquent l'apparition d'effets indésirables tels que des toxicités rénale et gastrointestinale, hypocalcémie et ostéonécrose de la mâchoire (Hussein et Komarova, 2011; Mantyh *et al.*, 2002). Pour ce qui est des anticorps anti-RANKL, des effets secondaires ont aussi été répertoriés, notamment l'ostéonécrose de la mâchoire (Rizzoli et Reginster, 2011). Ces traitements agissent de façon indirecte sur la douleur en diminuant la relâche de facteurs pouvant activer les fibres afférentes primaires par les cellules cancéreuses.

Pour ce qui est des opioïdes, et en particulier la morphine, ils sont le traitement le plus efficace pour diminuer la douleur modérée à sévère induite par le cancer osseux (Pantano *et al.*, 2011). Dans les études animales, la morphine se voit accorder différents effets contradictoires selon la lignée cellulaire impliquée, la dose injectée et le temps d'exposition (King et Porreca, 2010). Certaines études démontrent son efficacité pour diminuer la douleur cancéreuse osseuse tandis que d'autres indiquent qu'elle augmente la libération de neurotransmetteurs excitateurs et active la voie descendante facilitatrice de la douleur (Ossipov *et al.*, 2005). De plus, la morphine peut diminuer ou augmenter la destruction osseuse selon l'étude considérée (Cao *et al.*, 2010; El Mouedden et Meert, 2007; King *et al.*, 2007). La destruction osseuse induite par la morphine peut donc augmenter le risque de fractures chez les animaux cancéreux (King *et al.*, 2007). Chez les patients souffrant de douleur cancéreuse osseuse, différents effets secondaires associés aux opioïdes sont rapportés soit la constipation, la nausée, la sédation et la dépression respiratoire (Mantyh *et al.*, 2002). De plus, certains patients traités avec des opioïdes ressentent de la douleur à des sites non-associés à leur douleur d'origine (Mercadante *et al.*, 2003; Silverman, 2009). Ses nombreux effets indésirables découlent des doses élevées qui doivent être administrées aux patients pour soulager la douleur cancéreuse osseuse (Cherny, 2000). En effet, une étude animale a établi qu'une dose de morphine 10 fois plus élevée est nécessaire pour diminuer significativement la douleur cancéreuse osseuse comparativement à la douleur inflammatoire (Luger *et al.*, 2002).

	Classe	Cible	Effet	Effets secondaires
Traitement direct de la douleur	AINS	Enzymes COX	↓ douleur faible à modérée	Rénaux et gastrointestinaux
	Inhibiteurs COX-2	Enzyme COX-2	↓ douleur faible à modérée	Rénaux, cardiaques et gastrointestinaux (moins importants que pour les AINS)
	Morphine	Récepteur mu	↓ douleur sévère	Nausée, somnolence, constipation, dépression respiratoire et destruction osseuse (selon l'étude)
Traitement indirect de la douleur	Chimiothérapie	Cellules en division	↓ croissance tumorale	Fatigue et nausée
	Antagoniste ER α	ER α	↓ croissance tumorale (cellules hormonodépendantes)	↑ des risques de cancer de l'endomètre, de thrombose et des troubles de l'humeur
	Anticorps anti-RANKL	RANKL	↓ activité ostéoclastique	Ostéonécrose de la mâchoire
	Bisphosphonates	Ostéoclastes	↓ activité ostéoclastique	Rénaux, gastrointestinaux, hypocalcémie et ostéonécrose de la mâchoire
	Inhibiteurs aromatasase	Enzyme aromatasase	↓ croissance tumorale (cellules hormonodépendantes)	↑ des risques de cancer de l'endomètre, de thrombose et des troubles de l'humeur
	Radiothérapie	Cellules en division	↓ croissance tumorale	Fatigue et nausée

Tableau 2. Traitements actuels de la douleur cancéreuse osseuse.

Plusieurs traitements sont actuellement disponibles et prescrits aux patients souffrant de douleur cancéreuse osseuse. Ils sont offerts en mono- ou multi-thérapie et ciblent directement ou indirectement les éléments induisant la douleur cancéreuse osseuse.

Présentement, de 45 à 75% des patients atteints d'un cancer osseux ont un mauvais contrôle ou soulagement de leur douleur causé par une médication inadéquate et/ou des effets secondaires (Bertsche *et al.*, 2009; Meuser *et al.*, 2001). Pour arriver à la découverte d'un médicament permettant un meilleur soulagement de la douleur cancéreuse, différentes

étapes sont à franchir pour parvenir à un traitement alternatif prometteur. Une de ses étapes est la validation pré-clinique des molécules sélectionnées chez le rongeur. Il existe donc plusieurs tests comportementaux adaptés aux rongeurs, mais un seul permet le criblage de composés analgésiques avant la mise en place d'études animales fastidieuses soit le test à la formaline. En effet, ce test permet de présager les possibles effets analgésiques de molécules en douleur chronique, car il a été démontré que les résultats obtenus au test à la formaline corrélaient avec ceux obtenus en douleur chronique, telle que la douleur neuropathique, une composante de la douleur cancéreuse osseuse (Vissers *et al.*, 2003; Vissers *et al.*, 2006).

3. Test à la formaline

Le test à la formaline est caractérisé par l'apparition d'une douleur tonique, ou persistante, suite à l'injection de formaline, un stimulus chimique. Le site d'injection principalement préconisé est la partie plantaire d'une des pattes arrières où un volume oscillant entre 20 et 150 μL peut être injecté à une concentration variant entre 0,5 et 5% (Tjolsen *et al.*, 1992) (Sawynok, J. 2004 livre). L'injection de formaline induit instantanément une douleur se manifestant par une gamme de comportements nociceptifs, d'œdème et d'extravasation plasmatique (Coderre *et al.*, 1984; Yashpal et Coderre, 1998).

3.1 Méthodes d'analyse

Les comportements douloureux sont généralement observés sur une période de 60 minutes et sont quantifiés à l'aide de différentes méthodes d'analyse. Ces méthodes sont basées sur l'analyse d'un seul paramètre, l'analyse multivariée, l'analyse des comportements généraux ou l'analyse numérique (Abbott *et al.*, 1981; Dubuisson et Dennis, 1977; Fanselow, 1984, 1985; Holland et Goldstein, 1990; McLaughlin *et al.*, 1990; Porro *et al.*, 1991; Sugimoto *et al.*, 1986; Tjolsen *et al.*, 1991a; Tjolsen *et al.*, 1992; Tjolsen *et al.*, 1991b). Cette dernière est la méthode la plus couramment utilisée lors de l'observation des comportements

douloureux induits par la formaline. Le principe de l'analyse numérique est d'attribuer à chaque comportement douloureux une valeur numérique, ou stade, allant de 0 à 3, soit du comportement le moins douloureux à celui le plus douloureux (0 : patte normale, 1 : patte avec moins d'appui sur la surface, 2 : patte dans les airs, 3 : patte mordillée, secouée ou léchée). Suite à l'observation, la moyenne de l'intensité douloureuse est calculée en valeur numérique selon le temps passé dans chaque stade de douleur (Dubuisson et Dennis, 1977; Tjolsen *et al.*, 1992). Cette analyse permet de constater que la formaline génère une réponse bi-phasique comportant une phase aiguë (phase I) et une phase inflammatoire (phase II), séparées par une interphase (Figure 4).

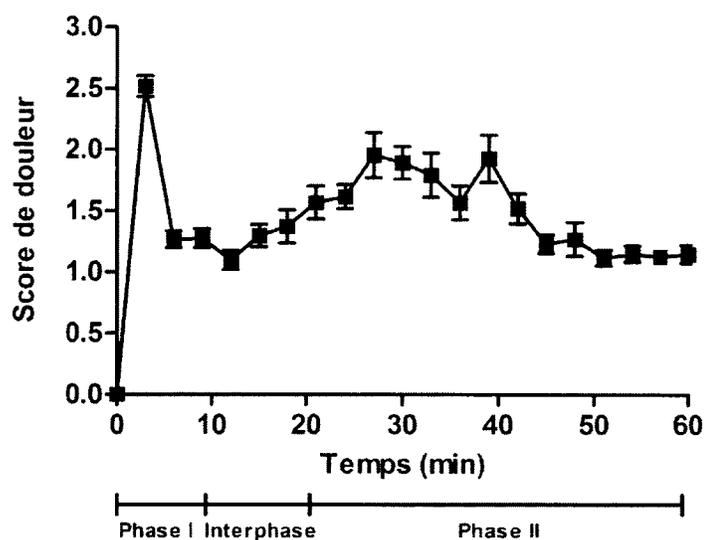


Figure 4. Phases du test à la formaline.

Suite à l'injection de formaline au niveau de la patte arrière d'un animal, une courbe de l'intensité de douleur en fonction du temps peut être obtenue permettant ainsi de distinguer trois phases soit la phase I, l'interphase et la phase II.

3.2 Description des phases du test à la formaline

La phase I survient immédiatement suite à l'injection de formaline et se poursuit jusqu'à la 9^e minute du test. Cette phase est induite par l'activation directe, via TRPA1, et indirecte, via des médiateurs pro-inflammatoires dont la bradykinine, la sérotonine, l'histamine et la

substance P, des fibres C suite à l'injection de formaline (Doak et Sawynok, 1997; Parada *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 1989). L'interphase s'enclenche de la 9^e à la 21^e minute du test. Elle est caractérisée par une atténuation et une stabilisation des comportements douloureux. L'interphase, indépendante de la concentration de formaline, est causée par une inhibition active. Cette inhibition active, impliquant les mécanismes GABAergiques, a été démontrée par des injections subséquentes de formaline à la 1^{ère} et à la 20^e minute du test produisant 2 interphases (Franklin et Abbott, 1993; Henry *et al.*, 1999). Enfin, la phase II débute à la 21^e minute et se poursuit au-delà de la 60^e minute du test. Elle est caractérisée par un retour et un maintien des comportements douloureux chez l'animal à l'étude. C'est lors de cette phase qu'un plateau de nociception peut être observé et ce entre la 20^e et la 35^e minute du test (Yashpal etCoderre, 1998). La phase II est une combinaison d'une réaction inflammatoire et d'une sensibilisation au niveau central, deux des phénomènes physiologiques activés lors de la phase I. Effectivement, il est possible d'inhiber les comportements nociceptifs de la phase II à l'aide, entre autres, d'opiacés injectés au niveau spinal avant et non après la phase I (Dickenson et Sullivan, 1987; Shibata *et al.*, 1989).

3.3 Changements spinaux engendrés par la formaline

La douleur induite par la formaline provoque des modifications au niveau de la moelle épinière dont l'augmentation de l'activité neuronale, observée à l'aide de l'expression de la protéine Fos via l'activation du gène *C-fos*. En fait, suite à l'injection de formaline, l'expression de la protéine Fos augmente de façon temps- et lamina-dépendant et ce seulement du côté ipsilatéral. Il a été noté que 1h après l'injection de formaline, le marquage de la protéine Fos est diffus et maximal au niveau des lamina superficielles (I-II et III-IV) comparativement aux lamina plus profondes (V-VI et VII-X) dont le marquage augmente à 2 et 4h post-injection (Abbadie *et al.*, 1992; Leah *et al.*, 1992; Presley *et al.*, 1990). L'expression de la protéine Fos augmente particulièrement dans les lamina I, II et V et ce au niveau des lombaires L4 et L5 où la majorité des afférences primaires en provenance des pattes arrières font synapses avec les neurones de second ordre. Du côté controlatéral à l'injection de formaline, une faible quantité de protéines Fos est exprimée à

partir de 2 et 4h post-injection particulièrement dans la lamina VIII (Presley,R.W. 1990) (Figure 5).

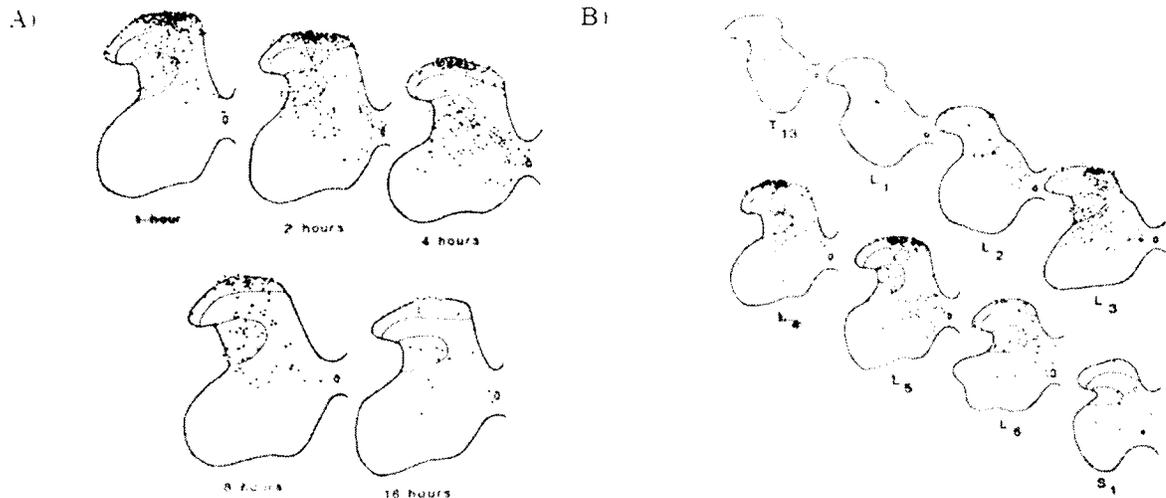


Figure 5. Activation spinale du gène *C-fos*.

A) La distribution laminaire de la protéine Fos suite à une injection de formaline varie en fonction du temps. Avec le temps, la protéine est davantage retrouvée dans les couches profondes de la moelle épinière. B) Suite à une injection de formaline, la protéine Fos est principalement localisée dans la partie lombaire de la moelle épinière et ce plus précisément au niveau L4 et L5.

Figure adaptée de (Porro et Cavazzuti, 1993)

Par ses caractéristiques, le test à la formaline permet d'identifier rapidement les composés ainsi que les doses ayant le potentiel d'induire des effets analgésiques en douleur chronique. En effet, il a été démontré que les résultats obtenus en phase II corrélaient avec ceux obtenus en douleur chronique neuropathique, une des composantes de la douleur cancéreuse osseuse (Vissers *et al.*, 2003; Vissers *et al.*, 2006). Puisque les traitements actuels de la douleur cancéreuse osseuse sont limités à l'usage d'opioïdes, de nouveaux traitements devront donc être étudiés et développés dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients. Une de ces nouvelles alternatives à considérer est la neurotensine (NT), un peptide induisant des effets analgésiques indépendants des voies opioïdiques (Clineschmidt *et al.*, 1979).

4. Neurotensine

En 1973, Carraway et Leeman extraient de l'hypothalamus bovin un peptide de 1674 Da ayant des propriétés hypotensives (Carraway et Leeman, 1973, 1975). Ce peptide est la neurotensine et se compose de 13 acides aminés dont les 6 derniers sont responsables de son activité biologique (Rostene et Alexander, 1997). Cette activité biologique est toutefois limitée par la présence d'endopeptidases. En effet, une fois relâchée, la NT est dégradée et inactivée par le clivage de sa partie C-terminale par des endopeptidases incluant les endopeptidases 24.11 et 24.16 (Almenoff *et al.*, 1981; Checler *et al.*, 1986; Vincent *et al.*, 1994). La demi-vie de la NT se retrouve donc limitée à environ 15 minutes au niveau cortical et de 2 à 6 minutes en périphérie (Barelli *et al.*, 1994; Checler *et al.*, 1986). Malgré une activité biologique écourtée, la NT influence plusieurs systèmes autant au niveau central que périphérique.

4.1 Rôles

La NT est exprimée dans le système nerveux central (SNC) et en périphérie. Dans le SNC, sa distribution est très étendue tandis qu'en périphérie, elle est principalement concentrée au niveau des intestins (Carraway et Leeman, 1976; Rostene et Alexander, 1997). Cette localisation lui confère différents rôles centraux et périphériques dont la prolifération de cellules tumorales et le contrôle de la perception de la douleur.

4.1.1 Contrôle de la douleur

L'implication de la NT dans la nociception est l'effet central neurotensinergique le plus documenté. La NT module le contrôle descendant de la douleur en intervenant dans la transmission nociceptive (Dobner, 2006). Suite à un stimulus douloureux, il a été démontré que la libération endogène de la NT ainsi que l'expression du gène de la NT sont augmentées dans la substance grise périaqueducale (PAG), structure hautement impliquée

dans le contrôle descendant de la douleur (Maeno *et al.*, 2004). De plus, plusieurs études font état des effets analgésiques de la NT injectée dans de nombreuses structures du SNC comme la moelle épinière, plus précisément au niveau lombaire, et des régions corticales (Hylden et Wilcox, 1983; Sarret *et al.*, 2005; Urban et Smith, 1993). Un fait particulier est que la NT induit des réponses opposées selon la dose utilisée. En effet, dans le noyau du raphé magnus, des doses de l'ordre du picomolaire favorisent l'hyperalgésie comparativement à des doses beaucoup plus élevées produisant de l'analgésie (Smith *et al.*, 1997; Urban et Smith, 1993). La NT provoque ses effets nociceptifs via deux de ses trois récepteurs, soit les récepteurs NTS1 et NTS2. Le tout a été illustré, entre autres, par l'utilisation de l'antagoniste, qui lie préférentiellement le récepteur NTS1 à faible dose, le SR48692, renversant partiellement l'effet analgésique de la NT (Sarret *et al.*, 2005).

4.1.2 Prolifération cancéreuse

La NT est exprimée dans différents tissus sains et également lorsque ceux-ci deviennent cancéreux tels que le pancréas, le côlon, le poumon et la prostate (Evers *et al.*, 1992; Ishizuka *et al.*, 1993; Sehgal *et al.*, 1994; Sethi *et al.*, 1992). Dans certains tissus, la NT fait son apparition seulement lorsque le tissu devient cancéreux tel est le cas du cancer du sein (Cross *et al.*, 1985; Elek *et al.*, 2000; Nesland *et al.*, 1991). En effet, la NT est absente du tissu mammaire sain, mais elle est présente chez les patients atteints d'un cancer du sein et incluant le cancer du sein invasif de type canalaire (Dupouy *et al.*, 2009; Souaze *et al.*, 2006). Dans cette condition, la présence de la NT est associée à une augmentation de l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Souaze *et al.*, 2006). L'effet de la NT au niveau du tissu mammaire cancéreux semble être induit par le récepteur NTS3 et, principalement, par le récepteur NTS1. Ce récepteur et la NT sont co-exprimés dans le tissu de cancer du sein invasif de type canalaire alors que le récepteur NTS2 n'y est pas exprimé (Somai *et al.*, 2002; Souaze *et al.*, 2006). De plus, le SR48692 renverse l'état invasif engendré par la NT (Souaze *et al.*, 2006).

4.2 Récepteurs

Tel que mentionné précédemment, la NT induit ses effets via trois sous-types de récepteurs, NTS1, NTS2 et NTS3, impliqués à différents niveaux, entre autres, dans la prolifération des cellules cancéreuses et le contrôle de la douleur.

4.2.1 NTS1

Un premier récepteur neurotensinergique, le récepteur NTS1, a été cloné et caractérisé chez le rat et l'humain au début des années 90 (Tanaka *et al.*, 1990; Vincent, 1992; Vita *et al.*, 1993). La structure primaire du récepteur est composée de 424 acides aminés chez le rat et de 418 acides aminés chez l'humain et celle-ci s'avère être identique à 84% entre ces deux espèces (Tanaka *et al.*, 1990; Tyler-McMahon *et al.*, 2000). Le poids moléculaire de ce récepteur à sept domaines transmembranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G est de 47 kilodaltons (kDa) (Vincent *et al.*, 1999).

Le récepteur NTS1 peut être couplé à trois protéines G soit $G_{q/11}$, qui active la phospholipase C, $G_{i/o}$, qui inhibe la production d'AMPc, et G_s , qui stimule la production d'AMPc (Bozou *et al.*, 1986; Gailly *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 1993). La protéine $G_{q/11}$ est la principale protéine G à laquelle le récepteur NTS1 de rat ou d'humain est couplé et ce dans tous les systèmes étudiés jusqu'à présent (Vincent *et al.*, 1999). Il a aussi été démontré que NTS1 de rat est couplé à la protéine $G_{i/o}$ chez des cellules de neuroblastome et chez des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) transfectées avec NTS1 de rat et l'exprimant de façon stable (Bozou *et al.*, 1986; Gailly *et al.*, 2000). Chez des cellules CHO transfectées avec NTS1 de rat ou d'humain et surexprimant ce récepteur, la protéine G_s est couplé au récepteur (Richard *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 1993). Certains segments du récepteur NTS1 sont importants pour le couplage des protéines $G_{q/11}$ et $G_{i/o}$ au récepteur soit la troisième boucle intracellulaire et la partie C-terminale respectivement. Cette section du récepteur serait aussi impliquée dans le couplage de la protéine G_s (Najimi *et al.*, 2002; Skrzydelski *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 1994). Une autre particularité de la partie C-terminale est qu'elle contient des résidus requis pour le

découplage de la protéine G associée, soit ser-415, thr-416 et ser-417, et l'internalisation du récepteur, soit thr-422 et tyr-424 (Chabry *et al.*, 1995; Claing, 2004; Oakley *et al.*, 2001). La liaison de la NT, au niveau de la troisième boucle extracellulaire du récepteur NTS1, mène donc à l'activation de différentes voies de signalisation impliquant la phospholipase C, l'AMPc, l'inositol phosphate, le calcium, l'acide arachidonique et les *mitogen activated protein kinases* (MAPK) (Bozou *et al.*, 1986; Ehlers *et al.*, 1998; Gailly *et al.*, 2000; Kitabgi, 2002; Poinot-Chazel *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 1993).

Le récepteur NTS1 est désigné comme étant le récepteur à haute affinité de la NT. En effet, la NT possède une affinité élevée pour le récepteur NTS1 de 0,1-0,3 nM chez l'humain (Vincent *et al.*, 1999). La liaison de la NT au récepteur NTS1 implique deux régions du récepteur soit la troisième boucle extracellulaire et la jonction extracellulaire des domaines transmembranaires 4 et 6 (Richard *et al.*, 2001). Une fois liée au récepteur, la NT forme avec lui un complexe qui sera internalisé. Cette internalisation nécessite la phosphorylation de résidus situés dans la partie C-terminale du récepteur soit la thréonine en position 422 et la tyrosine en position 424 (Chabry *et al.*, 1995). Une fois au niveau intracellulaire, le complexe se dissocie. Le récepteur NTS1 est dégradé dans les lysosomes tandis que la NT est transportée par les endosomes tardifs et/ou de recyclage vers l'appareil de Golgi (Vandenbulcke *et al.*, 2000).

L'ARN messager (ARNm) et la protéine du récepteur NTS1 sont exprimés dans certaines régions du SNC, mais davantage au niveau de la substance noire, de l'aire ventro- tegmentaire, du septum latéral, du noyau du lit de la strie terminale et des cortex préfrontal, cingulé, insulaire et suprarhinal (Alexander et Leeman, 1998; Boudin *et al.*, 1996; Elde *et al.*, 1990; Fassio *et al.*, 2000). L'ARNm du récepteur NTS1 a aussi été localisé au niveau des DRGs, mais non dans la moelle épinière, par hybridation *in situ* (Zhang *et al.*, 1995). Plus récemment, il a été démontré par immunohistochimie que la protéine du récepteur NTS1 était exprimée dans les DRGs de petit et moyen calibre en plus d'être présente au niveau des corps cellulaires des neurones de la moelle épinière et ce principalement dans les lamina superficielles (Roussy *et al.*, 2008). Cette divergence d'expression entre le transcrite et la protéine du récepteur NTS1 pourrait résulter de la sensibilité de la sonde utilisée pour l'hybridation *in situ* comparativement à celle de l'anticorps utilisé pour l'immunohistochimie (Ninkovic *et al.*, 1981; Roussy *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 1995).

L'expression du récepteur au niveau du SNC permet à la NT d'exercer différents effets dont des effets analgésiques. Le rôle du récepteur NTS1 dans l'analgésie induite par la NT a été démontré majoritairement en douleur aiguë, mais aussi en douleur tonique. En douleur aiguë, des études effectuées à l'aide de différentes techniques d'inactivation démontrent une absence de l'effet analgésique, résultat observé précédemment chez des animaux de type sauvage suite à l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de NT lors du test de la plaque chaude (Pettibone *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 1998a). D'autres recherches ont indiqué qu'une microinjection supraspinale du SR48692 renverse l'effet antinociceptif de la NT lors du test de retrait de la queue (Smith *et al.*, 1997; Urban et Gebhart, 1997). Cette observation a été décrite par une autre étude où l'analgésie induite par la NT ou un agoniste spécifique NTS1, le PD149163, injecté dans la médulla rostro-ventrale était bloquée par le SR48692 lors du même test (Buhler *et al.*, 2005). En douleur tonique, l'injection intrathécale (i.t.) de PD149163 a induit des effets analgésiques dans la phase II du test à la formaline. Ces effets étaient bloqués significativement par le SR48692 (Roussy *et al.*, 2008) (Figure 6).

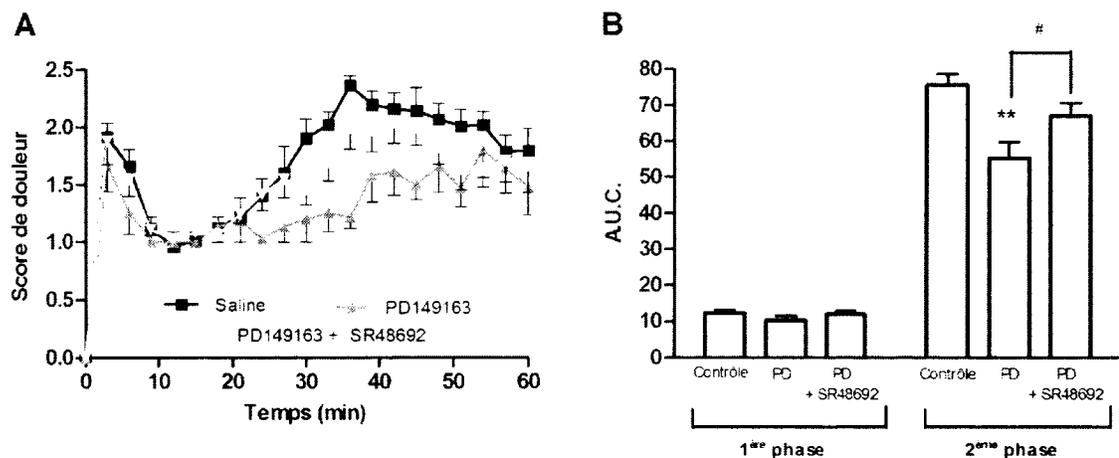


Figure 6. Impact du SR48692 sur les effets analgésiques du PD149163 en douleur tonique. (A) L'injection i.t. de 10 µg/kg PD14163 diminue les comportements douloureux induits par la formaline, spécialement lors de la phase II. Cette analgésie est inhibée par l'injection i.t. de 3 mg/kg SR48692. (B) La conversion des résultats en aire sous la courbe indique que la co-injection SR48692 et PD149163 renverse significativement, mais non complètement, les effets analgésiques du PD149163. Figure tirée de (Roussy *et al.*, 2008)

En situations pathologiques, la co-localisation du récepteur NTS1 et de la NT permet à celle-ci d'exercer ses effets tel qu'observé en présence d'un cancer du sein et en particulier le cancer du sein invasif de type canalaire (Souaze *et al.*, 2006). Un fait particulier est que le récepteur NTS1 est absent ou pratiquement absent du tissu mammaire sain, mais est exprimé lorsque celui-ci devient cancéreux tout comme la NT. Plus précisément, le récepteur NTS1 n'est pas ou est faiblement présent au niveau du tissu mammaire humain sain tandis qu'en conditions cancéreuses, 5 à 100% des tissus mammaires humains cancéreux étudiés l'expriment (Carraway et Plona, 2006 ; Reubi *et al.*, 1999; Somai *et al.*, 2002; Souaze *et al.*, 2006). La variation d'expression du récepteur NTS1 peut provenir des échantillons de cancer du sein analysés et de la sensibilité de la technique de révélation utilisée (autoradiographie (5%) vs immunohistochimie (50 à 100%)) (Reubi *et al.*, 1999; Somai *et al.*, 2002). L'implication du récepteur NTS1 dans le cancer du sein se situe au niveau de la survie cellulaire, de la croissance tumorale et de l'invasion cellulaire. En effet, il a été démontré qu'un agoniste sélectif du récepteur NTS1, le JMV-449, augmente le nombre de cellules viables et donc diminue le nombre de cellules mortes lors d'expérimentations *in vitro* faites à l'aide de cellules du cancer du sein humain, les cellules MCF-7 (Somai *et al.*, 2002). De plus, l'injection de SR48692 chez des souris immunosupprimées ayant reçu une injection sous-cutanée de cellules MDA-MB-231, exprimant le récepteur NTS1, a induit une diminution du volume et du poids des tumeurs. Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'injection sous-cutanée de cellules MDA-MB-231 modifiées pour ne plus exprimer le récepteur NTS1 (Souaze *et al.*, 2006). Pour ce qui est de l'implication du récepteur NTS1 dans l'invasion cellulaire, la présence de l'agoniste sélectif pour le récepteur NTS1, le JMV-449, a augmenté l'invasion des cellules MDA-MB-231 *in vivo*. Cet effet a été renversé par la co-injection du JMV-449 avec le SR48692 (Souaze *et al.*, 2006).

4.2.2 NTS2

Suite à la découverte du premier récepteur neurotensinergique, le récepteur NTS2 a été cloné par homologie avec le récepteur NTS1 de rat et de souris (Chalon *et al.*, 1996; Mazella *et al.*, 1996). La structure primaire du récepteur NTS2 est constituée de 416 acides aminés chez le rat et de 410 acides aminés chez l'humain (Vincent *et al.*, 1999). Le poids moléculaire de cet autre récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G est d'environ 46 kDa (Sarret *et al.*, 2005). Comparativement au récepteur NTS1, le récepteur NTS2 possède une troisième boucle intracellulaire et une partie C-terminale plus longues et une partie N-terminale plus courte. Malgré ces différences structurales, les deux récepteurs sont identiques à 43% et sont homologues à 64% (Vincent *et al.*, 1999).

À ce jour, les protéines G associées au récepteur NTS2 n'ont pas été clairement identifiées. Par contre, des évidences tendent à montrer que le récepteur NTS2 serait au moins couplé aux protéines G_{q11} et G_s . En effet, il a été démontré, chez des ovocytes de Xénope, que l'activation du récepteur NTS2 de souris mène à l'activation du canal chlore qui est calcium dépendante (Botto *et al.*, 1997). De plus, le récepteur NTS2 de rat présent chez des cellules granulaires du cervelet ou chez des cellules CHO transfectées de façon stable augmente le calcium intracellulaire et active la voie des MAPK (Yamada *et al.*, 1998). Pour ce qui est du récepteur NTS2 humain, une augmentation du calcium et de l'inositol triphosphate intracellulaires, une augmentation de la production d'acide arachidonique et l'activation de la voie des MAPK ont été observées chez des cellules CHO transfectées de façon stable avec le récepteur NTS2 (Gendron *et al.*, 2004; Vita *et al.*, 1998). Le récepteur NTS2 humain transfecté de façon transitoire chez des cellules CHO a provoqué une augmentation de l'inositol triphosphate (Richard *et al.*, 2001).

La NT possède une affinité pour le récepteur NTS2 de 1-5 nM chez l'humain (Vincent *et al.*, 1999). Chez l'humain, l'affinité de la NT pour le récepteur NTS2 est donc dix fois plus faible que pour celle du récepteur NTS1. Lorsque la NT et le récepteur NTS2 forme un complexe, celui-ci est internalisé via des vésicules de clathrine (Sarret *et al.*, 2002). À l'intérieur de la cellule, la NT est transportée par les endosomes tardifs et/ou de recyclage vers l'appareil de Golgi tandis que le récepteur est recyclé à la surface membranaire. Ce

recyclage est dépendant de la phosphorylation d'une seule tyrosine, la tyrosine 237, située dans la troisième boucle intracellulaire (Martin *et al.*, 2002).

L'ARNm et la protéine du récepteur NTS2 sont fortement exprimés dans le bulbe olfactif, le noyau du lit de la strie terminale, le noyau préoptique, l'amygdale, le noyau thalamique antérieur, la substance noire, l'aire ventro-tegmentaire, le cortex cérébelleux, la substance grise périaqueducule, le noyau dorsal du raphé, le noyau réticulé et le noyau du raphé magnus (Mazella *et al.*, 1996; Sarret *et al.*, 1998; Sarret *et al.*, 2003b; Walker *et al.*, 1998).

L'implication du récepteur NTS2 dans les effets neurotensinergiques est répertoriée principalement au niveau de la modulation de la douleur aiguë, mais aussi en douleur tonique. Cette implication a été démontrée, entre autres, à l'aide du « writhing test » consistant à injecter par voie intrapéritonéale de l'acide acétique pour induire une douleur aiguë, observée sous forme de crampes abdominales. Chez des souris déficientes pour le gène du récepteur NTS1, l'injection i.c.v. de NT a induit le même effet que chez des souris de type sauvage lors du « writhing test », ce qui spécifie que ce récepteur n'est pas impliqué dans l'analgésie induite par la NT dans ce test (Remaury *et al.*, 2002). Lors de ce même test, une analgésie est observée suite à l'injection i.c.v. d'un agoniste du récepteur NTS2, la lévocabastine (Dubuc *et al.*, 1999a). Toujours lors du « writhing test », l'injection d'oligonucléotides antisens NTS2 chez des souris a démontré une diminution de l'analgésie normalement observée après l'injection i.c.v. de NT (Dubuc *et al.*, 1999b). De plus, une étude effectuée à l'aide du test du retrait de la queue indique que l'analgésie observée suite à une injection intrathécale de NT chez des rats est induite par l'activation des récepteurs NTS2, car elle est toujours présente lors de l'injection d'agonistes sélectifs pour le récepteur NTS2, tels que le JMV-431 et la lévocabastine, et elle est partiellement inhibée par le SR48692, un antagoniste liant préférentiellement le récepteur NTS1 à faible dose, mais le récepteur NTS2 à plus forte dose (Sarret *et al.*, 2005). Il a été démontré lors du test de la plaque chaude qu'il n'y a aucune différence entre des souris de type sauvage et des souris déficientes pour le récepteur NTS1, contrairement à ce qui est observé avec des souris déficientes pour le récepteur NTS2. Cette étude indique donc que la NT provoque son effet antinociceptif, en partie, via le récepteur NTS2, car il y a diminution de son effet lorsque le récepteur est absent (Macno *et al.*, 2004). Lors du test à la formaline, la douleur tonique est diminuée en phase I et II par l'injection intrathécale de NT69L, un agoniste

non-sélectif des récepteurs NTS1 et NTS2. Cette analgésie est partiellement renversée par l'injection de SR48692 au niveau intrathécal indiquant l'implication du récepteur NTS2 dans cet effet (Roussy *et al.*, 2008).

Pour ce qui est de l'implication du récepteur NTS2 dans une pathologie telle que le cancer du sein, peu d'informations sont disponibles jusqu'à présent. En fait, aucun rôle ne semble lui être attribué dans cette pathologie et ce probablement en lien avec l'absence de son expression au niveau mammaire. En effet, Somaï et ses collaborateurs ont observé que le transcrite du récepteur NTS2 n'était aucunement exprimé dans les cellules de cancer du sein, les cellules MCF-7, contrairement à ceux des récepteurs NTS1 et NTS3 (Somai *et al.*, 2002).

4.3.3 NTS3

Le récepteur NTS3 a été purifié et cloné au courant des années 90 et il a la particularité d'être identique à 100% à la protéine gp95/sortiline (Mazella *et al.*, 1989; Mazella *et al.*, 1998; Zsurger *et al.*, 1994). Ce récepteur de type I, contrairement aux récepteurs NTS1 et NTS2, est composé d'un seul domaine transmembranaire. Il fait partie de la famille des récepteurs de type Vsp10p. Les récepteurs de cette famille possèdent des caractéristiques particulières dont un domaine riche en cystéines, un seul domaine transmembranaire et au moins un site de clivage à la furine, une protéine convertase (Mazella et Vincent, 2006). Le récepteur NTS3 est constitué de 833 acides aminés et son poids moléculaire est de 100 kDa (Mazella *et al.*, 1998). Même s'il possède des propriétés de liaison semblables au récepteur NTS1, le récepteur NTS3 a une affinité pour la NT variant selon sa composition. En effet, la partie N-terminale du récepteur est composée d'un site de clivage à la furine déterminant l'affinité du récepteur pour la NT (sans clivage : 10-20 nM et après clivage : 0,3 nM) (Mazella *et al.*, 1998). En plus de la NT, le récepteur NTS3 a la capacité de lier, entre autres, la lipoprotéine lipase, le précurseur du *nerve growth factor* (NGF) et le propeptide clivé lors de la maturation du récepteur NTS3 (inhibiteur dérivé du précurseur de NTS3) (Dicou *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005). Plusieurs régions du SNC expriment fortement le récepteur NTS3 ou son ARNm où le récepteur se retrouve dans les cellules gliales, les

neurones et les adipocytes (Sarret *et al.*, 2003a). Les effets liés à l'activation du récepteur NTS3 se retrouvent principalement au niveau des microglies et des cancers. L'implication du récepteur chez les microglies se situe au niveau de la migration, de l'activation de gènes et de la relâche de cytokines/chimiokines (Dicou *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005). De plus, le récepteur NTS3 est co-exprimé avec le récepteur NTS1 par différentes lignées cellulaires humaines du cancer du côlon, du pancréas, de la prostate et du sein (Dal Farra *et al.*, 2001; Somai *et al.*, 2002; Swift *et al.*, 2010). Jusqu'à présent, il a été démontré que le récepteur NTS3 est impliqué dans la prolifération de ces cancers (Dal Farra *et al.*, 2001). Par contre sa participation à la prolifération dans le cancer du sein n'a pas encore été confirmée malgré sa détection au niveau de tissus mammaires cancéreux (Dal Farra *et al.*, 2001; Somai *et al.*, 2002). Pour ce qui est du rôle du récepteur NTS3 dans la modulation de la douleur, aucune étude ne fait actuellement état d'une possible implication de ce récepteur dans ce phénomène.

OBJECTIFS DU PROJET

Actuellement, le traitement privilégié pour traiter la douleur cancéreuse osseuse demeure la morphine malgré son efficacité limitée par ses effets secondaires. Pour remédier à la situation, des modèles de douleur cancéreuse osseuse ont été développés et différentes molécules ont été évaluées pour tenter de soulager cette pathologie. Malheureusement, le traitement n'a guère évolué depuis plusieurs années. Quelques éléments peuvent être responsables de cette situation soit les modèles développés sont peu représentatifs de la pathologie et l'utilisation de tests comportementaux non appropriés pour caractériser cette douleur. L'élaboration d'un modèle plus représentatif de la réalité clinique et le développement d'appareils permettant l'analyse spécifique de la douleur cancéreuse osseuse sont nécessaires pour découvrir de nouvelles alternatives de traitement et améliorer le soulagement de la douleur cancéreuse osseuse.

Dans cette optique, les objectifs de ce projet sont de:

Développer un nouveau modèle de douleur cancéreuse osseuse chez la souris consistant en l'injection de cellules cancéreuses mammaires syngéniques.

Caractériser les comportements douloureux et les changements neurochimiques spinaux du modèle murin développé à l'aide de tests appropriés.

Déterminer l'efficacité analgésique des récepteurs NTS1 et NTS2 du point de vue comportemental et neurochimique via l'injection intrathécale d'agonistes sélectifs et de souris transgéniques en douleur tonique et cancéreuse osseuse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux et hébergement

Les expériences concernant le modèle de douleur cancéreuse osseuse ont été réalisées à l'aide de souris saines mâles C57BL/6 âgées de 12 semaines d'un poids moyen de 25g (Charles River, St-Constant, Qc, Canada). Le rôle des récepteurs NTS1 et NTS2 a été étudié à l'aide d'expériences réalisées chez des souris invalidées pour un de ces récepteurs, de souche C57BL/6, âgées de 12 semaines et ayant un poids moyen de 25g.

Ces souris ont tout d'abord été générées par croisement entre une souris de type sauvage C57BL/6 et une souris invalidée pour NTS1 ou NTS2 pour obtenir des souris de type sauvage et hétérozygotes (Maeno *et al.*, 2004). Par la suite, le maintien de la colonie a été assuré par des croisements hétérozygotes en évitant toute consanguinité. Le génotypage des souris générées a été déterminé par la technique de PCR, à partir d'ADN génomique extrait de la queue des souris âgées entre 10 et 21 jours à l'aide d'un protocole standard d'extraction au phénol-chloroforme. Brièvement, l'ADN a été incubé avec 10 mM dNTPs (GE Healthcare, Canada), 1 U *TAQ polymerase* (Roche, Canada) et 20 μ M de chaque paire d'amorces (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA). Les amorces suivantes ont été utilisées : NTS1 exon 2 sens : 5'-GTT AAC ACC TTC ATG TCC TTC CTG-3', NTS1 exon 2 anti-sens : 5-TAC GTA AGA CGA GGA CTC CAT GGC-3' (produit: 200 paires de base (pb)) / NTS1 néo 4 : 5'-GGA TCG GCC ATT GAA CAA GAT GG-3' / NTS1 néo 7 : 5'-CTT CAG CAA TAT CAC GGG TAG CC-3' (produit néo 4-7: 700 pb) / NTS2 exon 1 sens : 5'-ATC AGG CCA CCT CGA GAC AGA GAT G-3', NTS2 exon 1 anti-sens : 5'-GCA CGA AGT AAT AGC CAC GAC AGC C-3' (produit: 350 pb) / NTS2 néo 2 : 5'-GGC TAC CCG TGA TAT TGC TGA AGA G-3' (produit: 620 pb). Le protocole de PCR pour NTS1 a été une dénaturation de 2 minutes à 94°C, suivie de 30 cycles de 10 secondes à 96°C, 30 secondes à 59°C et 30 secondes à 72°C, pour terminer avec une extension finale de 5 minutes à 72°C. Pour ce qui est du protocole de PCR pour NTS2, il consistait à une dénaturation de 3 minutes à 94°C, suivie de 30 cycles de 40 secondes à 96°C, 60 secondes à 57°C et 1.5 minute à 72°C, pour terminer avec une extension finale de 5 minutes à 72°C.

Les souris ont été hébergées dans une salle d'hébergement possédant un cycle de 14h de luminosité/10 h de noirceur et ont eu un accès *ad libitum* à de la nourriture et de l'eau. Toutes les expérimentations ont été réalisées par le même expérimentateur dans une salle d'expérimentation calme entre 8:00 et 12:00 dans le but de réduire toute variation liée au rythme circadien. Les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité de protection des animaux l'Université de Sherbrooke (numéro du protocole éthique accepté : 027-09) et sont en accord avec les politiques et les directives du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

Douleur tonique

Injection de formaline chez la souris

Les souris mâles âgées de 12 semaines reçoivent une injection sous-cutanée de 20 μ L de 2% formaldéhyde (i.e. 5,4% formaline, Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada) au niveau de la surface plantaire de la patte arrière droite.

Injection intrathécale chez la souris (test à la formaline)

Cinq minutes avant l'injection de formaline, les souris mâles, non anesthésiées, sont injectées au niveau intrathécal à l'aide d'une aiguille 30 G1/2 dans l'espace subarachnoïde. Les souris reçoivent 10 μ g/kg de PD149163 (obtenu du *National Institute of Mental Health* via le *Chemical Synthesis and Drug Supply program*) ou 30 μ g/kg JMV-431 (synthétisé dans le laboratoire du Dr. Jean Martinez) dilué dans 5 μ L de saline physiologique (0.9% NaCl).

Douleur cancéreuse osseuse

Cellules cancéreuses

Les cellules E0771 (adénocarcinome médullaire de souche C57BL/6) ont été gracieusement fournies par le Dr. Francis M. Sirotnak du *Memorial Sloan-Kettering Center* (New York,

États-Unis). Les cellules ont été maintenues dans le milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 10% sérum de bovin fœtal, 10 mM pénicilline/streptomycine et 10 mM HEPES à une température de 37.5°C et un taux de 5% CO₂.

Caractérisation des cellules E0771

RT-PCR

L'ARN total de la moelle épinière et des cellules E0771 a été extrait à l'aide d'un protocole standard d'extraction au TRIZOL, protocole fourni par le manufacturier (Invitrogen Gibco, ON, Canada). Après l'extraction, l'ARN a été quantifié avec un appareil NanoDrop® (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). La transcription inverse a été réalisée avec l'*Omniscript RT kit* de Qiagen (Qiagen, Canada) selon le protocole fourni par la compagnie. L'ARN (2 µg) de chaque échantillon a été incubé 5 minutes à 25°C, 1 heure à 42°C et 15 minutes à 70°C dans un *PCR Thermocycler* (Biometra, Goettingen, Germany). Ensuite, l'ADNc (5 µL) a été amplifié avec 10 mM dNTPs (GE Healthcare, Canada), 1 U *TAQ polymerase* (Roche, Canada) et 1 mM de chaque paire d'amorces (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA). MMP2 sens : 5'-CCTTAAAAGTATGGAGCGACGTCA-3', anti-sens : 5'-GATACTGGATGCCGTCTATGTCGT-3' (produit: 244 paires de base) / MMP9 sens : 5'-ACCCTGTGTGTTCCCGTTCAT-3', anti-sens : 5'-GATACTGGATGCCGTCTATGTCGT-3' (produit: 466 pb) / ERα sens : 5'-AGGTGCCCTACTACCTGGAGA-3', anti-sens : 5'-CAGAGGCATAGTCATTGCACA-3' (produit: 220 pb) / ERβ sens : 5'-CAGTCCTGCTGTGATGAACTACA-3', anti-sens : 5'-CTCTTGGCGCTTGGACTAGTAAC-3' (produit: 284 pb) / GAPDH sens : 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGAC-3', anti-sens : 5'-GTGAAGGT CGGTGTGAACGG-3'). Le protocole de PCR pour MMP2 et MMP9 a été une dénaturation de 1 minute à 94°C, suivie de 30 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C, pour terminer avec une extension finale de 5 minutes à 72°C. Le protocole de PCR pour ERα et ERβ a été une dénaturation de 1 minute à 94°C, suivie de 34 cycles de 40 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C, pour terminer avec une extension finale de 5 minutes à 72°C. Le protocole de PCR pour GAPDH a été une dénaturation de 1 minute à 94°C, suivie de 25 cycles de 40 secondes à 94°C, 40 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C, pour terminer

avec une extension finale de 5 minutes à 72°C. Le gène de la GAPDH a été utilisé comme référence pour valider les PCR. Pour éliminer toute possibilité de contamination, l'amplification par PCR a aussi été réalisée en absence d'ADNc. L'ADNc amplifié (10 µL) a été migré sur un gel de 2% d'agarose fait avec du TBE 1X et contenant 0.5X SYBR® *Safe DNA gel strain* (Invitrogen Gibco, ON, Canada).

Immunobuvardage de type Western

Les cellules E0771 mises en culture, les tumeurs obtenues suite à l'injection sous-cutanée des cellules E0771 et les tumeurs obtenues suite à l'injection intra-fémorale des cellules E0771 ont été homogénéisées séparément avec un *Polytron* dans 50 mM Tris-HCl pH 7.5, et 5 mM EDTA contenant 1% Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases (Bioshop, Burlington, ON, Canada). Ensuite, le tout a été centrifugé à 24 000g pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines contenues dans le surnageant ont été dénaturées dans d'un tampon d'échantillon, le tampon Laemmli (0.375 mM Trisma base, pH 6.8, 12% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS), 30% v/v glycerol, 20% v/v b-mercaptoethanol, and 0.2% w/v bromophenol blue). Les protéines (25 µg) ont ensuite été séparées par électrophorèse à l'aide d'un gel de 10% SDS-polyacrylamide. Un marqueur de poids moléculaire coloré a été utilisé pour déterminer le poids moléculaire des protéines révélées (Biorad, Mississauga, ON, Canada).

Suivant la migration, les protéines ont été transférées pendant 1 heure à 22°C sur une membrane de polyvinylidene difluoride (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada). La membrane a été incubée pendant 2 heures à 22°C avec du *Tris-buffered saline* (TBS; pH 7.5) contenant 0.05% Tween 20 et 6% lait évaporé en poudre pour bloquer les sites non-spécifiques. La membrane est par la suite incubée en présence de l'anticorps primaire anti-MMP9 (*rabbit anti-rat MMP9 polyclonal antibody*; 1 : 2000; Millipore, MA, États-Unis) dans la solution de blocage toute la nuit à 4°C. Après des lavages avec du TBS Tween 20 (0.05%), la membrane a été incubée 1 heure à 22°C avec l'anticorps secondaire (*horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody*; 1 : 10000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis) dans 0.05% TBS Tween contenant 3% de lait évaporé en poudre.

Les protéines ont été visualisées et révélées sur un film à l'aide d'un *enhanced chemiluminescent detection kit* (PerkinElmer, Boston, MA, USA). Le film obtenu a été numérisé avec une imprimante HP Scanjet 4070 Photosmart (Mississauga, ON, Canada) et l'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel Photoshop version 8.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Analyse sous-cutanée des cellules E0771

Les cellules E0771 (3×10^4) ont été injectées dans un volume de 200 μL de HBSS au niveau sous-cutané chez des souris mâles C57BL/6. Après l'injection, le volume tumoral sous-cutané a été déterminé et mesuré à chaque jour à l'aide d'un appareil de mesure (*caliper*). Pour obtenir le volume exact de la tumeur, la formule suivant a été utilisée :

$(\pi/6) \times \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{hauteur}$ (Penet *et al.*, 2011).

Après le suivi, les souris ont été anesthésiées et perfusées via l'aorte avec 4% paraformaldéhyde (PFA) à 4°C diluée dans 0.1 M PB à pH 7.4. Suite à l'extraction des tumeurs, celles-ci ont été post-fixées dans 4% PFA toute la nuit et le lendemain, les tumeurs ont été paraffinées. Les blocs de paraffine ont été coupés à l'aide d'un microtome pour obtenir des coupes de 5 μm qui ont été préservées sur lame. Le jour de l'expérimentation, les lames ont été déparaffinées et colorées selon un protocole standard d'hématoxyline-éosine (Service de pathologie du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada).

Procédure chirurgicale pour induire la douleur cancéreuse osseuse

Sous anesthésie par inhalation de 3% d'isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada) combiné à 1 litre/minute d'oxygène, le site chirurgical a été rasé et désinfecté avec de l'éthanol 70% et de la dovidine (Laboratoire Atlas, Montreal, QC, Canada). Une incision de 1 cm a été faite sur la peau et le muscle surmontant la patella du fémur droit dans le but d'exposer le condyle droit de la patella et sans toucher les ligaments patellaires et sans pratiquer une arthrotomie. Une mèche en acier de 5 mm a été utilisée pour pré-percer le condyle. Ensuite, une aiguille 30 G 1/2 a été utilisée pour finaliser le passage jusqu'au canal médullaire fémoral, correspondant au site d'injection. Un volume de 5 μL d'HBSS

(sham) ou de 5 μ L d'HBSS contenant 3×10^4 cellules E0771 (cancer) a été injecté dans le canal médullaire à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 30 G 1/2. Pour prévenir la fuite du volume injecté à l'extérieur du fémur, le site d'injection a été scellé avec de l'amalgame dentaire (Kerr Corporation, Orange, CA, États-Unis) durcit avec une lampe polymérisante (Densply, Woodbridge, ON, Canada). Après une irrigation du site chirurgicale avec de la saline 0.9%, le muscle et la peau surmontant la patella ont été suturés.

Imagerie osseuse

Faxitron

Au jour 18 suivant la chirurgie, les souris ont été euthanasiées et perfusées via l'aorte avec 4% PFA (Fisher Scientific, Montreal, Quebec, Canada) à 4°C. Le fémur ipsilatéral, os ayant subi la chirurgie, a été prélevé et imagé dans l'appareil Faxitron MX-20 (Faxitron, Lincolnshire, IL, États-Unis) à 26 KV avec une exposition de 10 secondes et un grossissement de 2X (Centre de recherche sur le tissu osseux et le parodonte, Montréal, Québec, Canada).

Imagerie par résonance magnétique

Les études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été réalisées au Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke à l'aide d'un appareil pour petits animaux de 7 Teslas (Varian, Palo Alto, CA, États-Unis) et d'une antenne RF de 40 mm de type millipede. Les souris aux jours 11, 14 et 18 post-chirurgie ont été anesthésiées par inhalation de 2% d'isoflurane combiné à 1 litre/minute d'oxygène. Les souris ont été placées sur le dos dans un lit en Plexiglas muni d'un support en plastique fait maison permettant le maintien des pattes arrières de façon stable et reproductible. La température corporelle a été maintenue à un niveau physiologique à l'aide d'un système d'air tempéré et la respiration a été continuellement surveillée lors de l'expérience. Le protocole d'IRM incluait une acquisition sagittale pré-contraste et 10 minutes post-contraste. Les images pondérées T_1 ont été obtenues à l'aide d'une séquence d'écho gradient avec un TR : 290ms, TE : 6.21 ms, angle d'inversion: 30 degrés, matrix : 512x256, FOV : 60x30 mm², NA : 8

(20 coupes), 1 mm d'épaisseur. Un volume de 180 μL d'agent de contraste (*gadolinium diethylene thiamine pentaacetate* (Gd-DPTA), Magnevist, Berlex) a été injecté via un cathéter installé dans la veine caudale. Chacune des images a été analysée à l'aide du logiciel Matlab version 7.1 (Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, États-Unis) et a été superposée avec le logiciel Adobe Photoshop (États-Unis).

Analyse micro-tomodensitométrie

L'analyse micro-tomodensitométrie ($\mu\text{-CT}$) a été réalisée à l'aide d'un scanner $\mu\text{-CT}$ de haute performance (SkyScan-1072, Aartselaar, Belgique) et l'analyse architecturale 3D subséquente a été réalisée avec des applications associées au logiciel (Centre de recherche sur le tissu osseux et le parodonte, Montréal, Québec, Canada). Brièvement, après l'imagerie par Faxitron, les fémurs ont été enveloppés de Para-Film pour prévenir toute déshydratation pour être ensuite scanné avec une source de rayons X de puissance 45 kV / 222 μA et une résolution spatiale de 15.63 μm / pixel. La rotation a été fixée à 0.9 degrés / étape pour 180 degrés et le temps d'exposition a été déterminé à 2.8 secondes / étape. La reconstruction, basée sur les images obtenues suite au scan $\mu\text{-CT}$, a été élaborée avec le logiciel NRecon (version 1.6.1.3). Le logiciel CT-Analyzer (version 1.10.0.1) a été utilisé pour analyser les paramètres architecturaux en 3D et créer les modèles 3D en se basant sur les images transversales obtenues à partir de la reconstruction. La région d'intérêt (ROI) couvre le segment de 2,28 mm à partir de la plaque de croissance de la partie distale du fémur. Elles ont été définies séparément selon la portion à analyser pour son contenu osseux (trabéculaire ou cortical).

Injection de drogues chez la souris (modèle cancer)

Injection intrathécale d'agonistes neurotensinergiques

Aux jours 3, 7, 11, 14 et 18 post-chirurgie, les souris, non anesthésiées et contentionnées, sont injectées par voie intrathécale à l'aide d'une aiguille 30 G1/2. Les souris sont traitées avec 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PD149163 ou 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de JMV-431 dilué dans 5 μL de saline physiologique. Les souris contrôles sont injectées avec de la saline physiologique. Les injections intrathécales sont effectuées 10 minutes avant le premier test comportemental.

Injection sous-cutanée de morphine

Les souris, non anesthésiées et contentionnées, sont injectées au niveau sous-cutané avec 30 mg/kg de morphine (Sandoz, Montreal, QC, Canada) diluée avec de la saline physiologique 15 minutes avant le premier test comportemental aux jours 3, 7, 11, 14 et 18 suivant l'injection des cellules cancéreuses. Les souris contrôles ont reçu de la saline physiologique.

Analyse comportementale

von Frey

L'allodynie mécanique a été mesurée avec un appareil de von Frey automatique (Stoelting, Ugo Basil, IL, États-Unis). Les souris ont été individuellement acclimatées à l'appareillage (cage en Plexiglas déposée sur un grillage métallique) lors des deux jours précédents le premier jour d'expérimentation (jour -1, 3, 7, 11, 14 et 18 post-chirurgie). Le filament de von Frey a été appliqué sur la surface plantaire de chacune des pattes arrières avec un gradient de pression passant de 0 à 4 grammes en 5 secondes. Les mesures d'allodynie mécanique ont été répétées cinq fois/patte en alternance.

Test de distribution pondérale dynamique

Aux jours -1, 3, 7, 11, 14 et 18 suivant l'injection des cellules E0771, le test de distribution pondérale dynamique (*Dynamic Weight Bearing*, DWB, Bioseb, France) a été utilisé pour analyser l'inconfort lors de l'ambulation. Les souris ont été placées dans une enceinte de Plexiglas possédant un plancher composé de 1936 capteurs piézoélectriques pendant cinq minutes où elles sont libres de tout mouvement. Les souris n'ont pas été acclimatées pour ce test. Une patte est détectée par l'appareil lorsqu'un capteur enregistre un poids minimal de deux grammes et qu'au moins deux capteurs adjacents enregistrent un poids minimal de 0,5 gramme. L'analyse des segments d'expérimentation a été validée en accord avec l'enregistrement vidéo de la souris lors de l'expérimentation et de la cartographie des zones détectées émise par le logiciel (version utilisée du logiciel DWB de Bioseb: 1.3.3.6d). Chaque zone détectée est identifiée comme étant une patte avant ou arrière, une patte gauche ou droite ou une autre zone telle que la queue.

Rotarod

La douleur induite par le mouvement forcé a été analysée à l'aide du Rotarod (IITC, Woodland Hills, CA, États-Unis) aux jours -1, 3, 7, 11, 14 et 18 post-chirurgie. Ce test permet de mesurer indirectement la douleur induite par le mouvement forcé à l'aide d'un comportement, l'utilisation de la patte, qui pourrait lui être associé. Les souris ont été individuellement acclimatées à l'appareillage (cylindre en rotation) lors des deux jours précédents le premier jour d'expérimentation. L'utilisation de la patte ipsilatérale (patte ayant subi la chirurgie) est notée entre 0 et 4 (0 : aucune utilisation, 1 : utilisation partielle, 2 : boitement, 3 : utilisation normale). L'observation a été réalisée à une vitesse constante de 12 tours/minute pendant deux minutes à raison de cinq répétitions/jour.

Actimètre

Suite aux tests comportementaux précédemment décrits, les souris ont été hébergées dans des nouvelles cages, sans enrichissement de l'environnement, entourées de rayons infrarouges. L'activité motrice des souris a été mesurée de 19h00 à 7h00 aux jours -1, 3, 7, 11, 14 et 18 post-chirurgie. Les données ont été analysées avec le logiciel MotorMonitor (version 5.05) par Kinder Scientific (Poway, CA, États-Unis).

Analyse statistique

Analyse micro-tomodensitométrie

Les données ont été représentées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (S.E.M.). L'analyse de la variance à un facteur (*one-way*) a été réalisée par le logiciel Prism 5.04 (Graph Pad Software, San Diego, CA, États-Unis) pour comparer le groupe sham du groupe cancer. Un post-hoc de Dunnett a été appliqué pour définir les différences entre les groupes. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée statistiquement significative.

Tests comportementaux

Les données ont été représentées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (S.E.M.). Toutes les analyses ont été réalisées par le logiciel Prism 5.04 (Graph Pad Software, San

Diego, CA, États-Unis). L'analyse de la variance à deux facteurs (*two-way*) suivi d'un post-hoc de Bonferroni a été utilisée pour déterminer la significativité des différences observées entre les souris sham et celles atteintes d'un cancer osseux. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée statistiquement significative.

RÉSULTATS

Caractérisation des cellules E0771

Pour évaluer le profil hormono-dépendant des cellules E0771 d'origine mammaire, l'expression de l'ARNm des récepteurs oestrogéniques ER α (200 pb) et ER β (284 pb) a été déterminée à l'aide du PCR. Les résultats indiquent que les cellules E0771 expriment l'ARNm des deux récepteurs oestrogéniques, dévoilant la possibilité d'une variation de la prolifération et de la survie cellulaire en présence des hormones chez les femelles (Figure 7A).

Les E0771 sont reconnues comme étant hautement invasives (Sirotnak *et al.*, 1993) (Ewens *et al.*, 2006). Des analyses par PCR de l'expression d'ARNm de MMP2 (224 pb) et MMP9 (466 pb), métalloprotéinases impliquées dans le développement du cancer du sein, confirment cette caractéristique (Figure 7A). De plus, l'expression protéique de MMP9 est observée par immunobuvardage de type Western à partir des échantillons de cellules E0771 mises en culture, de tumeurs obtenues suite à l'injection sous-cutanée des cellules E0771 et de tumeurs obtenues suite à l'injection intra-fémorale des cellules E0771 (Figure 7B). Les protéines détectées chez les cellules E0771 en culture possèdent un poids moléculaire légèrement plus élevé (environ 125 kDa) comparativement aux tumeurs sous-cutanées et osseuses démontrant un poids moléculaire aux environs de 100 kDa (proenzyme MMP9: 95-98 kDa, MMP9 active: 88-92 kDa).

Dans le but de déterminer leur taux de croissance et leur morphologie *in vivo*, les cellules E0771 ont été injectées au niveau sous-cutané chez des souris mâles C57BL/6. Un suivi quotidien a révélé un taux de croissance essentiellement linéaire des tumeurs sous-cutanées entre le premier jour de détection de la tumeur ($178.9 \pm 45.7 \text{ mm}^3$), soit en moyenne le treizième jour post-injection, et ce jusqu'au dernier jour d'observation ($776.3 \pm 165.4 \text{ mm}^3$), soit au huitième jour post-détection. À partir du jour cinq, le taux de croissance des tumeurs formées par les E0771 commence à être légèrement moins linéaire (Figure 7C). Suite à ce suivi, les souris ont été perfusées et une analyse histologique de la tumeur a été

effectuée à l'aide d'une coloration hématoxyline-éosine. L'infiltration des cellules E0771 dans les tissus adipeux et musculaire (non montré sur la figure) environnant, le pléomorphisme des cellules et la présence de cellules cancéreuses indifférenciées, de mitose et d'apoptose révèlent que les cellules E0771 sont hautement infiltrantes et malignes (Rosen, 2008) (Figure 7D).

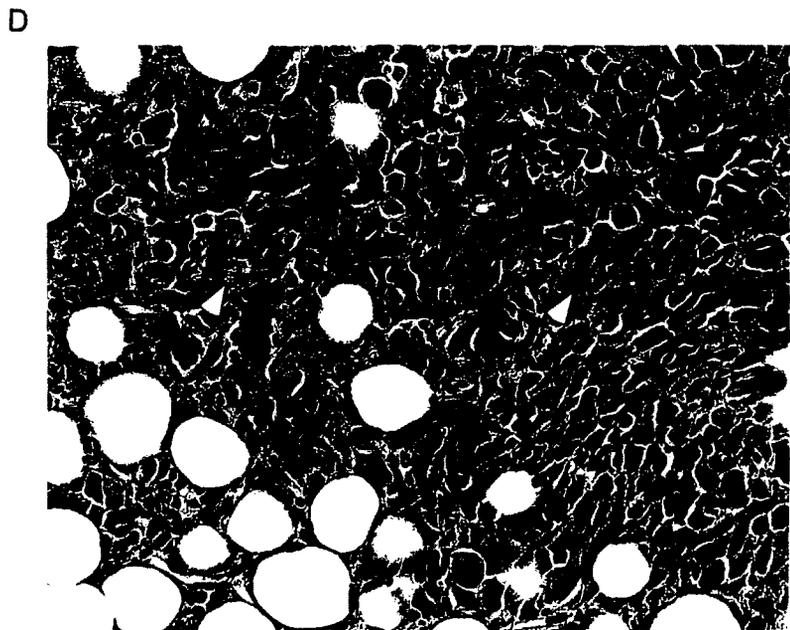
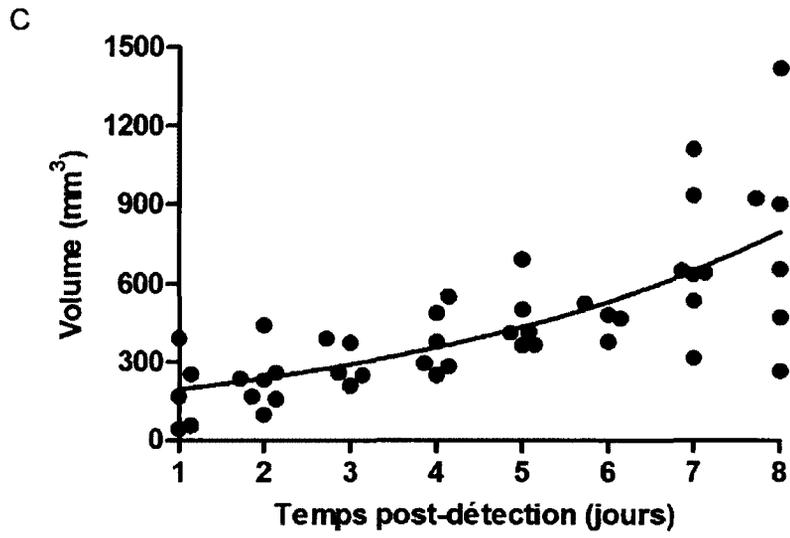
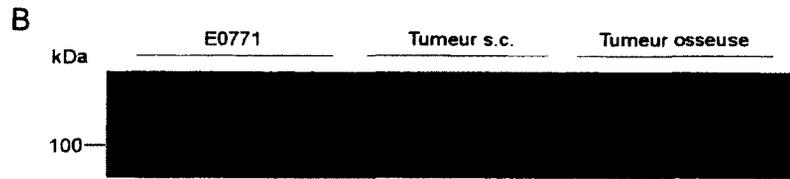
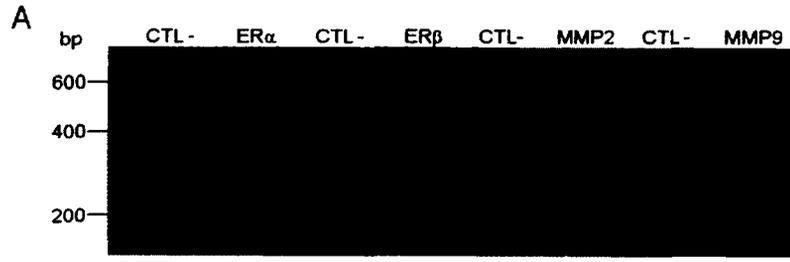


Figure 7. Profil des cellules cancéreuses E0771.

(A) Les aspects hormono-dépendants et invasifs des cellules E0771 ont été révélés par PCR via l'expression d'ER α , ER β , MMP2 et MMP9. (B) L'expression protéique de MMP9 chez des cellules E0771 mises en culture, de tumeurs obtenues suite à l'injection sous-cutanée des cellules E0771 et de tumeurs obtenues suite à l'injection intra-fémorale des cellules E0771 a été détectée par immunobuvardage de type Western. (C) L'injection s.c. des cellules E0771 résulte en une croissance tumorale linéaire. (D) La tumeur s.c. montre une capacité d'invasion par le pléomorphisme des cellules et la présence de cellules cancéreuses indifférenciées, de mitose et d'apoptose.

CTL - : contrôle négatif / Flèches noires : mitose / Flèches blanches : apoptose.

Changements osseux observés suite à l'injection des cellules E0771

L'imagerie par Faxitron a été utilisée pour visualiser l'impact de l'injection intra-fémorale des cellules E0771 sur la structure osseuse. Les images illustrent une destruction osseuse progressive entre les jours 11 et 18 post-chirurgie au niveau de l'épiphyse distal, correspondant au site d'injection (flèche noire). Comparativement à l'os cortical, l'os trabéculaire s'y retrouve hautement affecté (Figure 8A). Au jour 18, conséquemment à la fragilisation du fémur, une fracture est notée chez plusieurs souris.

Dans cette étude, l'IRM a permis de visualiser l'invasion tumorale au niveau fémoral. La coloration ajoutée aux images de fémur pour discriminer la tumeur osseuse a été réalisée suite à la détermination d'un seuil établi à partir d'une intensité de signal. Les os cortical et trabéculaire du fémur controlatéral sont intacts et aucune accumulation de l'agent de contraste n'est détectée (Figure 8B). Du côté ipsilatéral, une augmentation graduelle de l'agent de contraste au niveau de la diaphyse est notée entre les jours 11 et 18 post-chirurgie, correspondant à la croissance tumorale. Une baisse de l'accumulation de l'agent de contraste apparaît dans certaines régions lorsque la tumeur envahie progressivement la cavité fémorale ce qui représente des zones nécrotiques. Au jour 18, une augmentation de contraste est observée autour de l'os pouvant indiquer une inflammation du périoste et/ou de l'œdème (Figure 8B).

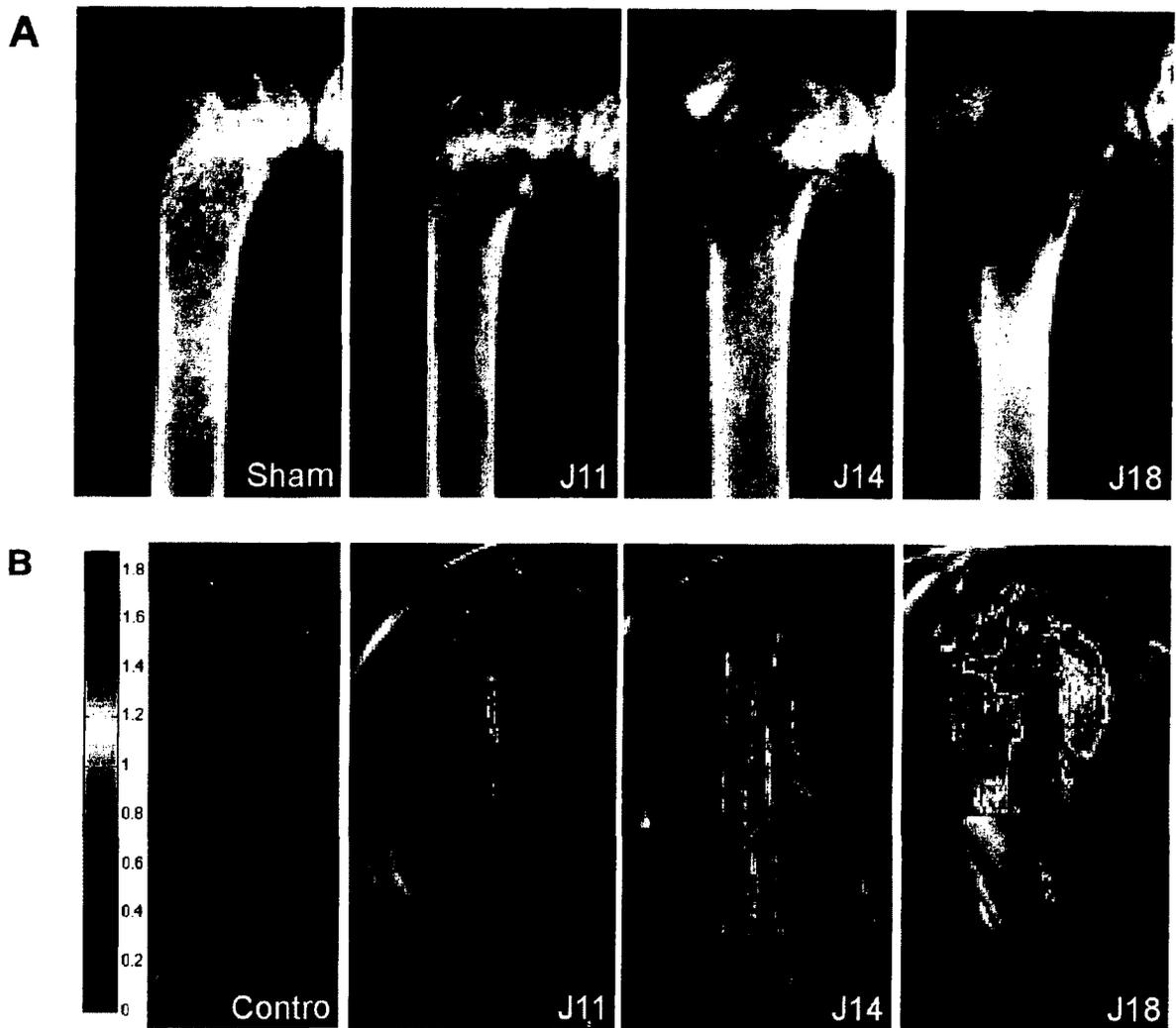


Figure 8. Perte d'intégrité osseuse chez les souris atteintes d'un cancer osseux.

Au Faxitron, aucune atteinte osseuse n'est observée chez les souris sham tandis que chez les souris porteuses d'une tumeur osseuse, des dégradations corticale et trabéculaire sont détectées entre les jours 11 et 18, spécialement au niveau de la tête fémorale. (B) À l'IRM, une augmentation du contraste) dans le canal fémoral et autour du fémur est détectée entre les jours 11 et 18 chez les souris cancéreuses. Aucune accumulation d'agent de contraste n'est présente du côté du fémur controlatéral (n'ayant pas reçu la chirurgie (contro)) des souris ayant un cancer osseux.

Flèche noire : site d'injection des cellules cancéreuses.

Spectre d'IRM : échelle relative d'accumulation d'agent de contraste

La densité et la réorganisation osseuses ont été obtenues par analyse μ -CT. Les résultats démontrent une perte osseuse sévère et progressive entre les jours 11 et 18 post-chirurgie,

spécialement au niveau de la tête fémorale. De plus, la diaphyse des fémurs ayant reçu l'injection des cellules E0771 développe un aspect rugueux aux jours 14 et 18 comparativement aux fémurs contrôles (Figure 9A). Des paramètres osseux ont été mesurés à partir de l'analyse μ -CT de la région d'intérêt débutant à la plaque de croissance de l'épiphyse distal et se terminant où la diaphyse commence. Une diminution du volume osseux reporté sur le volume tissulaire (BV/TV) dévoile une destruction de la structure osseuse aux jours 14 et 18. La réduction du BV/TV calculé pour l'os entier atteint $37 \pm 3\%$ au jour 14 et $48 \pm 6\%$ au jour 18 tandis que le BV/TV de l'os trabéculaire seul est diminué de $84 \pm 6\%$ au jour 14 et de $82 \pm 8\%$ au jour 18 (Figure 9B et C). Les facteurs tels que le facteur de motif trabéculaire (*trabecular pattern factor*, Tb.Pf.) et l'épaisseur trabéculaire (*trabecular thickness*, Tb.Th.) sont significativement modifiés en présence des cellules E0771 indiquant des changements trabéculaires. Le Tb.Pf., qui est un indice de connectivité de l'os trabéculaire, augmente jusqu'à $113 \pm 28\%$ au jour 18 chez les souris cancéreuses indiquant une perte de l'organisation de l'os trabéculaire (Figure 9D). Pour ce qui est du Tb.Th., qui mesure l'épaisseur des composantes trabéculaires, il diminue chez les souris atteintes d'un cancer osseux de $26 \pm 10\%$, $33 \pm 6\%$ et $35 \pm 6\%$ aux jours 11, 14 et 18 respectivement (Figure 9E).

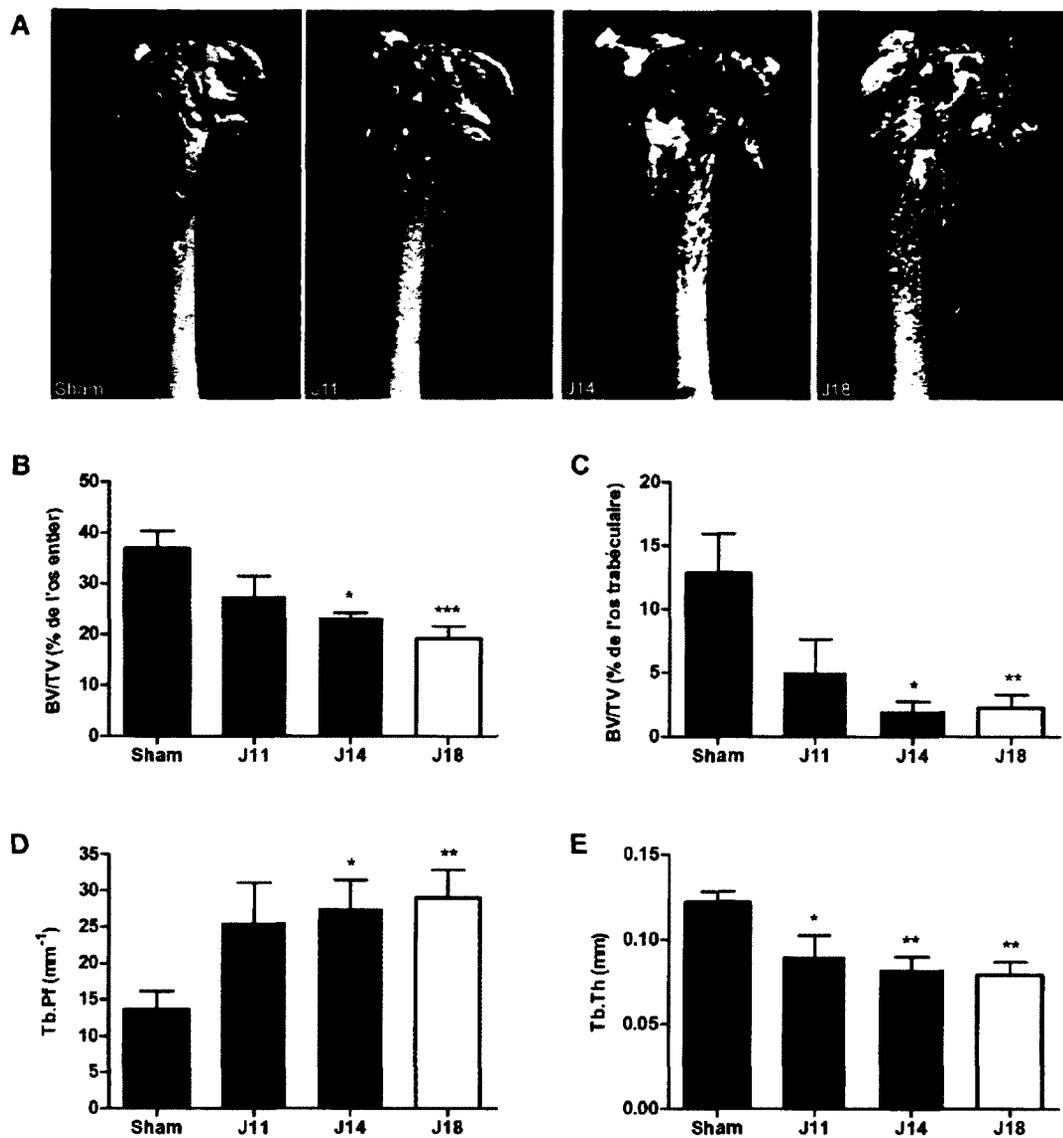


Figure 9. Atteinte osseuse progressive induite par le développement cancéreux.

(A) Les images obtenues par μ -CT indiquent que les os cortical et trabéculaire des souris porteuses d'une tumeur osseuse sont dégradés en fonction de la progression tumorale entre les jours 11 et 18. L'analyse μ -CT au niveau de la région d'intérêt démontre (B) une diminution du BV/TV pour l'os entier, (C) une réduction du BV/TV pour l'os trabéculaire, (D) une augmentation du Tb.Pf. et (E) une diminution du Tb.Th. chez les souris cancéreuses.

BV/TV, Tb.Pf et Tb.Th : sham (n = 9), cancer (n = 5-7)

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 comparé aux souris sham (contrôles)

BV/TV : volume osseux/volume tissulaire, Tb.Pf : facteur de motif trabéculaire, Tb.Th : épaisseur trabéculaire

Induction de douleur cancéreuse osseuse par les cellules E0771

L'implantation des cellules E0771 au niveau fémoral induit une destruction osseuse importante menant à de la douleur sévère spontanée et induite par le mouvement. Dans le modèle développé au laboratoire, les souris développant un cancer osseux métastatique expriment du côté ipsilatéral de l'allodynie mécanique, ou douleur induite par le toucher, dès le jour 11 post-chirurgie. Cette allodynie mécanique est significative aux jours 11 ($12 \pm 3\%$), 14 ($32 \pm 3\%$) et 18 ($51 \pm 3\%$) chez les souris cancéreuses comparativement aux souris sham (Figure 10A). Du côté controlatéral, aucune différence n'est détectée entre les deux groupes d'animaux au von Frey.

En parallèle de la douleur induite par le toucher, les souris atteintes d'un cancer osseux montrent progressivement des signes de troubles moteurs ou inconfort ambulateur, associés avec la douleur induite par le mouvement chez les patients atteints de cancer (Portenoy *et al.*, 2010). Pour évaluer l'altération de la distribution pondérale chez l'animal en mouvement, le DWB a été utilisé. Les souris cancéreuses déposent moins de poids sur leur patte ipsilatérale que les souris sham à partir du jour 11 post-chirurgie pour atteindre un niveau maximal de $75 \pm 4\%$ au jour 18. Une compensation pondérale est notée du côté controlatéral chez les souris cancer aux jours 14 ($18 \pm 4\%$) et 18 ($17 \pm 4\%$) (Figure 10B). À chaque jour d'expérimentation, aucune variation du poids ipsilatéral et controlatéral n'a été détectée chez les souris sham.

Pour supporter ces observations, l'inconfort ambulateur a aussi été vérifié à l'aide de l'actimètre. Les mouvements de base, caractérisés par un changement complet de la position de la souris dans l'appareil, ont été comptés durant la période active des rongeurs soit la nuit (20h à 6h). Les souris ayant un cancer osseux exécutent moins de mouvements de base que les souris sham aux jours 14 ($36 \pm 6\%$) et 18 ($51 \pm 6\%$), résultat d'un inconfort locomoteur (Figure 10C). Chez le groupe contrôle l'activité locomotrice s'est révélée normale tout au long du paradigme expérimental.

De façon concomitante à l'allodynie mécanique et à l'inconfort ambulateur, les souris cancéreuses développent de la douleur induite par le mouvement forcé qui peut être mesurée au Rotarod. Cet appareil permet de déterminer l'utilisation de la patte affectée

lorsque le mouvement est forcé. Chez les souris développant un cancer osseux, l'utilisation de la patte ipsilatérale diminue de $21 \pm 6\%$ au jour 11, $41 \pm 5\%$ au jour 14 et $72 \pm 5\%$ au jour 18 comparativement aux souris sham démontrant aucune déficience motrice (Figure 10D).

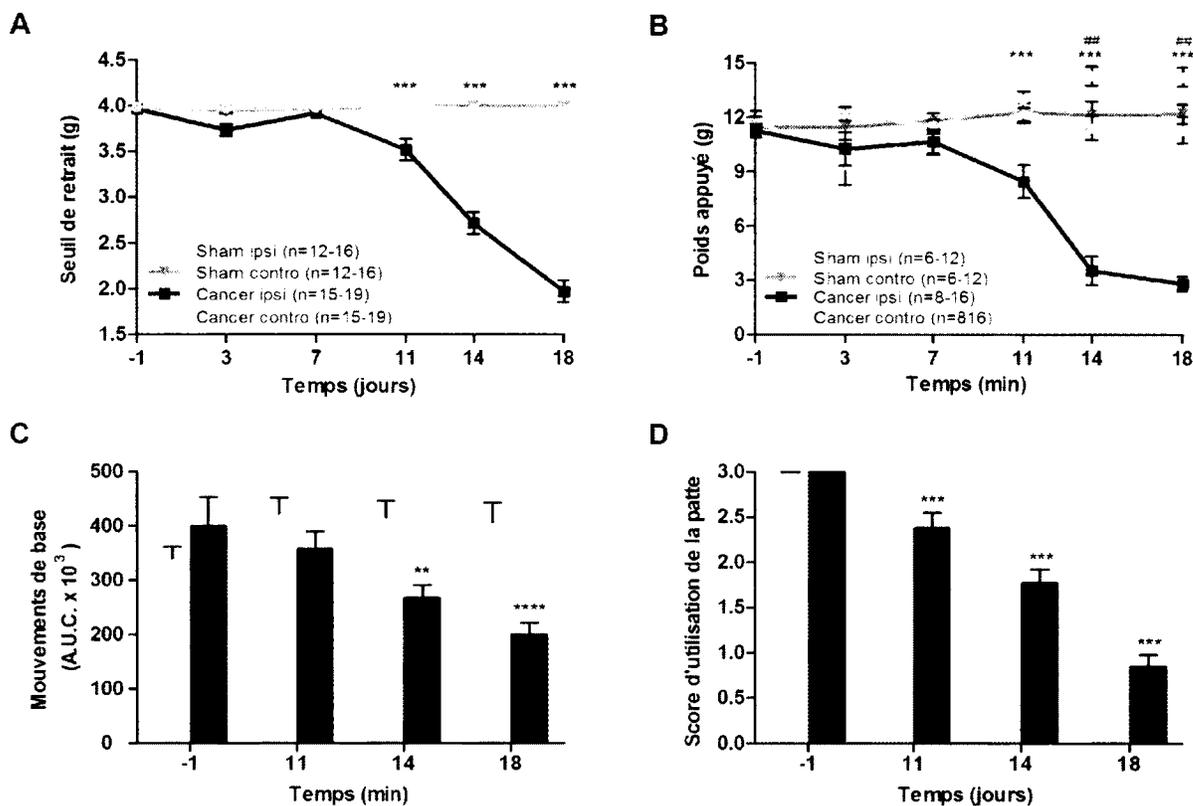


Figure 10. Analyse comportementale suite à l'injection des cellules E0771.

La douleur cancéreuse osseuse a été induite par l'injection de cellules mammaires métastatiques au niveau fémoral. (A) L'allodynie mécanique est détectée dès le jour 11 et progresse jusqu'au jour 18 au niveau de la patte ipsilatérale des souris ayant reçu l'injection des cellules E0771. (B) Au DWB, la diminution du poids appuyé sur la patte ipsilatérale est compensée du côté controlatéral (contro) des souris cancéreuses, indiquant un inconfort ambulateur. (C) Cet inconfort a aussi été révélé à l'actimètre où les souris développant un cancer osseux ont effectué moins de mouvements de base aux jours 14 et 18. (D) Au Rotarod, la douleur induite par le mouvement forcé augmente progressivement entre les jours 11 et 18 chez les souris porteuses d'une tumeur osseuse.

Actimètre : sham (n = 6-10), cancer (n = 6-11)

Rotarod : sham (n = 10-13), cancer (n = 11-15)

** P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001 comparé à la patte ipsilatérale des souris sham

P < 0.01 comparé à la patte controlatérale des souris sham

Altération de l'activité neuronale spinale par la douleur cancéreuse osseuse

L'immunohistochimie *C-fos* a été effectuée pour évaluer l'activité neuronale spinale au 18^e jour suivant l'injection des cellules E0771 dans le canal médullaire fémoral. Le protocole a été réalisé au niveau du segment L1 à L3 de la moelle épinière, car il correspond à la région où il y a projection des fibres afférentes primaires provenant du fémur (Peters *et al.*, 2005). L'observation des résultats obtenus démontre que le marquage *C-fos* des moelles épinières des souris sham est quasi inexistant comparativement au souris cancéreuses ayant un marquage plus important et présent au niveau de toute la substance grise de la moelle épinière (Figure 11A et B). Plus spécifiquement, du côté ipsilatéral, l'activation neuronale du gène *C-fos* augmente significativement chez les souris cancéreuses dans les lamina I-II ($343 \pm 139\%$), III-IV ($725 \pm 166\%$), V-VII ($1100 \pm 92\%$) et X ($1138 \pm 316\%$) (Figure 11C). Pour ce qui est du côté controlatéral, le nombre de neurones positifs pour le gène *C-fos* comptés est moins élevé que du côté ipsilatéral pour les deux groupes d'animaux. Par contre, une augmentation est quand même perceptible entre les souris sham et celles ayant reçu l'injection des cellules E0771 au niveau des lamina III-IV ($1378 \pm 394\%$) et V-VII ($244 \pm 62\%$) (Figure 11D).

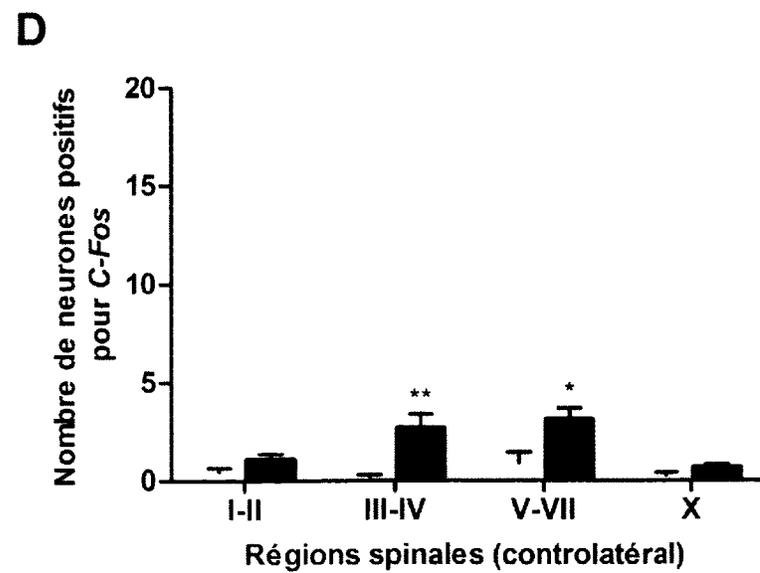
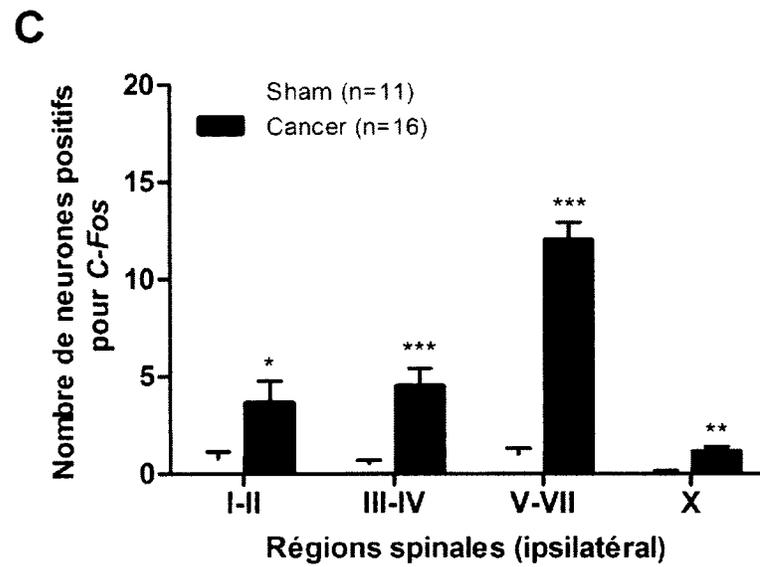
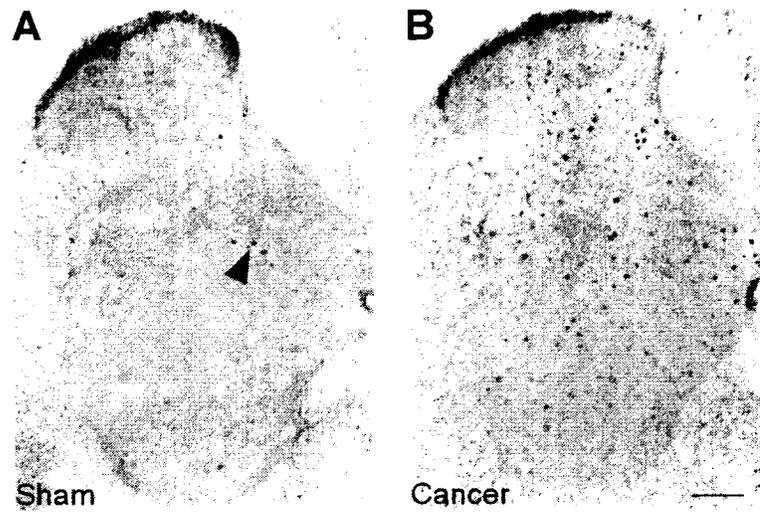


Figure 11. Activité neuronale spinale induite par la douleur cancéreuse osseuse.

Suite à une immunohistochimie dirigée contre *C-fos* effectuée sur les moelles épinières de souris (A) sham et (B) cancer, un décompte neuronal a été réalisé. Les données représentent la moyenne \pm SEM du décompte de neurones positifs pour le gène *C-fos* au niveau des lamina I-II, III-IV, V-VI et X du segment L1-L3 de la moelle épinière au jour 18. (C) Du côté ipsilatéral, une augmentation de l'expression du gène *C-fos* est observée dans les lamina I-II, III-IV, V-VII et X chez les souris ayant un cancer. (D) Une augmentation du marquage est aussi notée du côté controlatéral (contro) dans les lamina III-IV et V-VIII chez les souris porteuses d'une tumeur osseuse.

Flèche noire : neurone exprimant *C-fos*

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 comparé aux souris sham

Échelle : 125 μ m

Effets de la morphine sur les comportements douloureux en cancer osseux

L'injection sous-cutanée de morphine a été effectuée pour valider le modèle de douleur cancéreuse osseuse développé au laboratoire puisque la morphine est le traitement de référence et de choix actuel pour soulager ce type de douleur. Une dose de 30 mg/kg a été choisie, car il a été démontré que cette dose est la plus efficace pour renverser de façon significative la majorité des comportements douloureux observés en cas de cancer osseux (Luger *et al.*, 2002). La morphine diminue l'allodynie mécanique de la patte ipsilatérale normalement observée suite à l'injection des cellules E0771 au niveau fémoral. Une augmentation du seuil de retrait de $13 \pm 0\%$, $47 \pm 0\%$ et $81 \pm 6\%$ aux jours 11, 14 et 18 respectivement est notée suite à l'injection de morphine (Figure 12A). Au Rotarod, l'injection de morphine réussit à renverser positivement la douleur induite par le mouvement forcé aux jours 14 ($62 \pm 1\%$) et 18 ($112 \pm 26\%$) (Figure 12B).

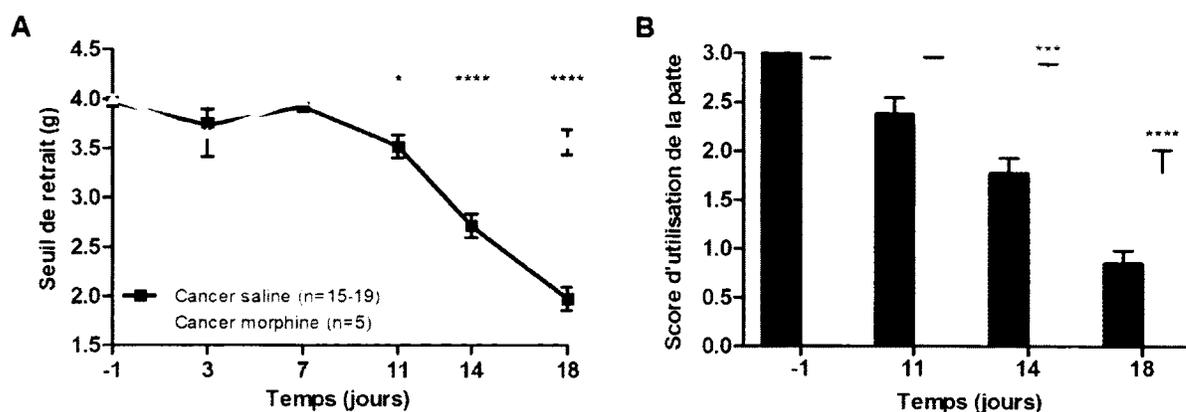


Figure 12. Analgésie morphinique en douleur cancéreuse osseuse.

La morphine (30 mg/kg) a été injectée au niveau sous-cutané à chaque jour de tests. (A) Chez les souris développant un cancer osseux, la morphine renverse l'allodynie mécanique normalement développée entre les jours 11 et 18 suivant l'injection des cellules E0771. (B) Au Rotarod, la morphine diminue la douleur induite par le mouvement forcé aux jours 14 et 18 chez les souris cancéreuses.

Rotarod : saline (n = 11-15), morphine (n = 5)

* P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001 comparé aux souris atteintes d'un cancer traitées avec de la saline (contrôle)

Effets analgésiques du PD149163 et du JMV-431 en douleur tonique chez la souris

Suite au criblage de différentes doses d'agonistes neurotensinergiques en douleur tonique chez le rat, le JMV-431 (30 µg/kg) et le PD149163 (10 µg/kg) ont été sélectionnés pour la confirmation et l'évaluation de leur efficacité analgésique en douleur tonique chez la souris (voir les articles Roussy *et al.*, 2008 et Roussy *et al.*, 2009 (ci-joint à la page 68)). Tout comme chez le rat, l'injection i.t. de 30 µg/kg de JMV-431, un agoniste sélectif pour NTS2, n'induit aucun impact sur la douleur en phase I (phase aiguë soit de la 1^{ère} à la 9^e minute), mais diminue significativement la douleur tonique lors de la phase II (phase inflammatoire soit de la 18^e à la 60^e minute) chez la souris (Figure 13A et B). Pour ce qui est du PD149163, un agoniste sélectif pour NTS1, injecté par voie i.t. à une dose de 10 µg/kg, aucun effet analgésique n'a été observé en phase I, mais une réduction significative de la douleur tonique en phase II du test à la formaline a été notée autant chez le rat que chez la souris (Figure 13C et D).

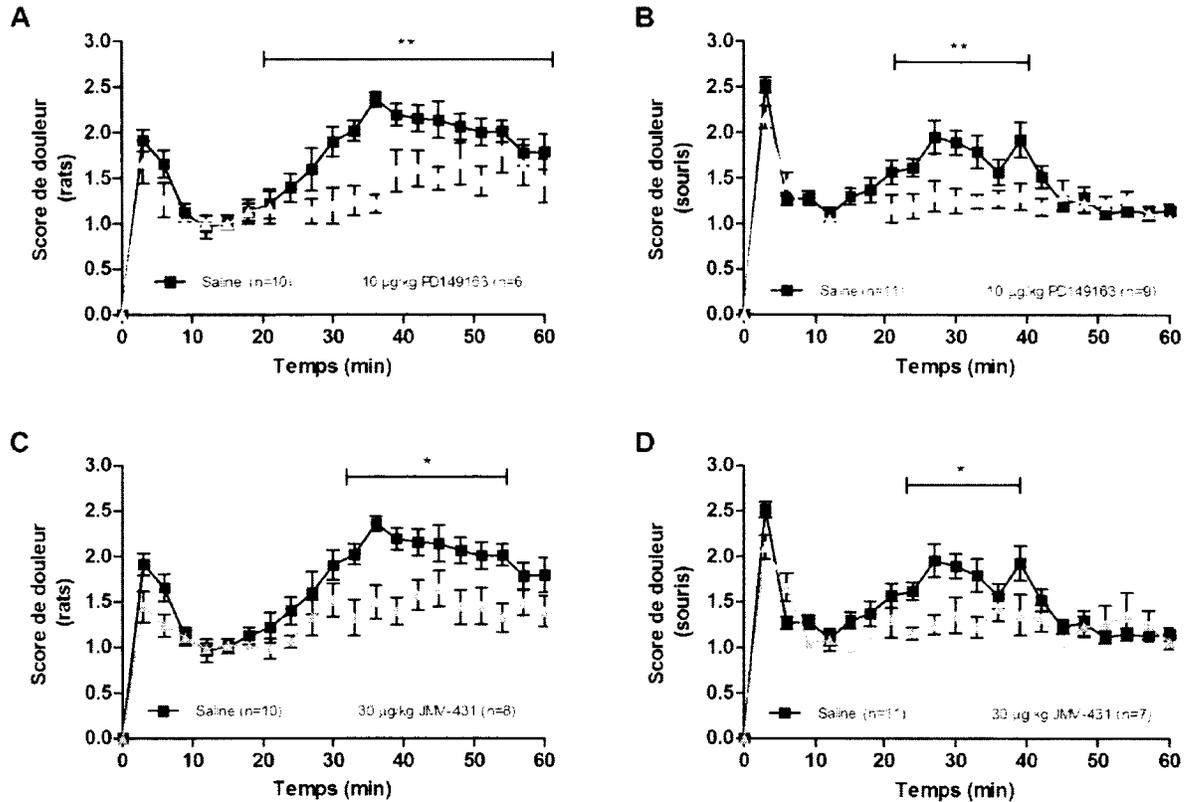


Figure 13. Effets analgésiques du PD149163 et du JMV-431 en douleur tonique chez le rat et la souris.

(A) Le PD149163 injecté par voie i.t. à une dose de 10 µg/kg réduit les comportements douloureux engendrés par la formaline, spécialement lors de la phase II du test. (B) Il a induit un effet analgésique similaire chez la souris lors de la phase II du test à la formaline suite à une injection i.t.. (C) L'injection i.t. de 30 µg/kg de JMV-431 parvient à diminuer la douleur tonique, mais uniquement lors de la phase II du test à la formaline effectué chez le rat (D) Un résultat similaire a été obtenu suite à l'injection au niveau i.t. de la même dose de JMV-431 chez la souris.

* P < 0.05; ** P < 0.01 comparé aux animaux traités avec de la saline (contrôle)

Implication des récepteurs NTS1 et NTS2 au niveau osseux

Suite à l'injection de cellules mammaires cancéreuses dans le canal fémoral, la destruction osseuse est favorisée au détriment de la formation osseuse. Ce phénomène a été observé à l'aide de la tomodynamométrie. Comparativement aux animaux sham, une perte osseuse est

visuellement perceptible chez les animaux de type sauvage (WT) et ceux invalidés pour le récepteur NTS1 ou NTS2 au jour 18 post-chirurgie (Figure 14A).

Quantitativement, BV/TV, le facteur de motif trabéculaire et l'épaisseur trabéculaire chez les souris porteuses d'une tumeur osseuse, tous génotypes confondus sont significativement atteints. Pour l'os entier, le BV/TV est réduit de $45 \pm 7\%$ chez les souris WT, de $33 \pm 4\%$ chez les souris KO NTS1 et de $37 \pm 4\%$ chez les souris KO NTS2 (Figure 14B). Lorsque l'os trabéculaire est uniquement considéré, le BV/TV indique la même tendance où les souris WT, KO NTS1 et KO NTS2 démontrent une diminution de $76 \pm 11\%$, $70 \pm 12\%$ et $80 \pm 4\%$ respectivement (Figure 14C). Le facteur de motif trabéculaire est, pour sa part, augmenté chez les souris WT ($67 \pm 22\%$), KO NTS1 ($62 \pm 21\%$) et KO NTS2 ($58 \pm 10\%$) indiquant une perte d'organisation osseuse au niveau de l'os trabéculaire (Figure 14D). Le dernier facteur examiné, l'épaisseur trabéculaire, est aussi diminué et ce de $29 \pm 7\%$ chez les souris WT, $14 \pm 8\%$ chez les souris KO NTS1 et de $21 \pm 5\%$ chez les souris KO NTS2 (Figure 14E). Les facteurs de tomодensitométrie regardés sont tous significativement différents entre les souris sham et les autres groupes, mais aucune différence n'est observée entre les trois génotypes.

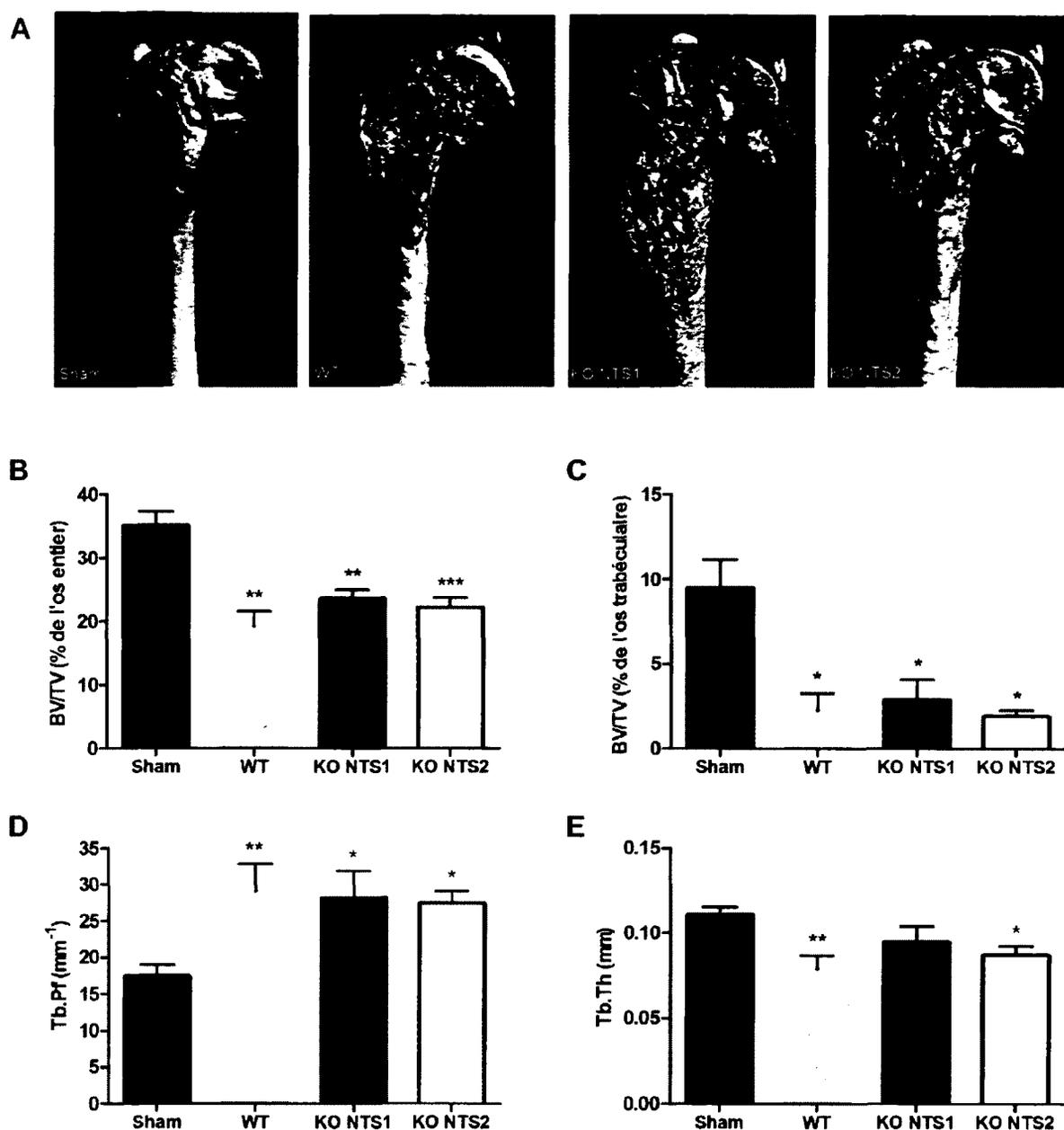


Figure 14. NTS1 et NTS2 dans la dégradation de la matrice osseuse

(A) Au jour 18, les images obtenues par μ -CT indiquent que les os cortical et trabéculaire sont autant atteints chez les souris cancéreuses WT, KO NTS1 et KO NTS2. L'analyse μ -CT au niveau de la région d'intérêt démontre qu'il n'y a aucune différence significative entre les souris cancéreuses WT, KO NTS1 et KO NTS2 au niveau (B) du BV/TV pour l'os entier, (C) du BV/TV pour l'os trabéculaire, du (D) Tb.Pf. et du (E) Tb.Th.

BV/TV, Tb.Pf et Tb.Th : sham (n = 9), WT (n = 7), KO NTS1 (n = 6), KO NTS2 (n = 6)

* P < 0.05; ** P < 0.01 comparé aux souris sham (contrôle)

Implication du récepteur NTS1 en douleur cancéreuse osseuse

L'injection i.t. de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PD149163 a significativement amélioré l'allodynie mécanique chez les souris porteuses d'une tumeur et ce aux jours 11 ($12 \pm 1\%$), 14 ($28 \pm 6\%$), et 18 ($62 \pm 8\%$) suivant la chirurgie (Figure 15A). Les souris cancéreuses invalidées pour récepteur NTS1 ont aussi manifesté moins d'allodynie mécanique soit $13 \pm 1\%$, $26 \pm 11\%$ et $22 \pm 6\%$ aux jours 11, 14 et 18 respectivement (Figure 15B). Au niveau de l'inconfort ambulateur, le PD149163 et l'inactivation du récepteur NTS1 n'ont induit aucune amélioration chez les souris atteintes d'un cancer osseux (Figure 15C et D). Au Rotarod, le PD149163 a été inefficace pour renverser la douleur induite par le mouvement forcé (Figure 15E). Par contre, chez les souris cancéreuses invalidées pour le récepteur NTS1, moins de douleur induite par le mouvement s'est développée suite à la chirurgie. Une différence de $24 \pm 1\%$ au jour 11, de $52 \pm 9\%$ au jour 14 et de $123 \pm 26\%$ au jour 18 a été notée entre les souris porteuses d'une tumeur osseuse invalidées pour le récepteur NTS1 et celles de type sauvage (Figure 15F).

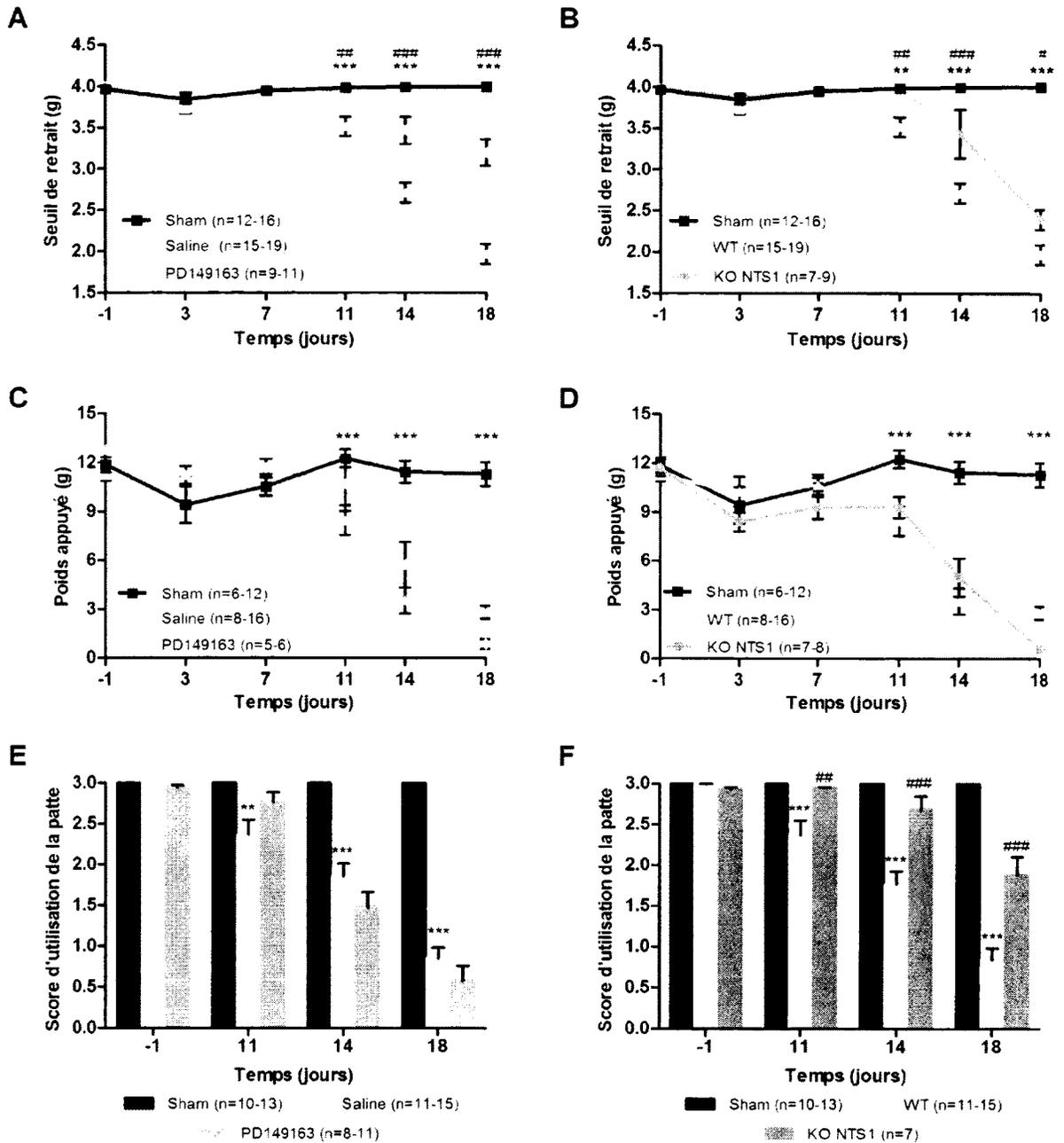


Figure 15. Effets du PD149163 et de l'inactivation de NTS1 en douleur cancéreuse osseuse.

(A) L'injection i.t. de PD149163 a renversé l'allodynie mécanique des souris atteintes d'un cancer aux jours 11 à 18, (B) résultat aussi observé chez les souris cancéreuses invalidées pour le récepteur NTS1 entre les jours 11 à 18. Pour ce qui est de l'inconfort ambulateur, (C) les souris traitées avec le PD149163 et (D) celles invalidées pour le récepteur NTS1 ont démontré le même niveau d'inconfort que les souris cancéreuses contrôles. (E) Au Rotarod,

le PD149163 n'a eu aucun impact sur la douleur induite par le mouvement forcé. (F) Par contre, la douleur induite par le mouvement forcé s'est moins développée chez les souris KO NTS1 comparativement aux souris WT.

** P < 0.01; *** P < 0.001 comparé aux souris sham

P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.001 comparé aux souris porteuses d'une tumeur osseuse traitées avec de la saline ou aux souris WT

Effets du récepteur NTS2 sur la douleur induite suite à l'injection des cellules E0771

Les souris atteintes d'un cancer osseux traitées avec 30 µg/kg de JMV-431 démontrent moins d'allodynie mécanique que les souris cancéreuses traitées avec de la saline aux jours 11 ($11 \pm 1\%$), 14 ($41 \pm 2\%$) et 18 ($70 \pm 9\%$) post-chirurgie (Figure 16A). Lorsque le récepteur NTS2 est absent, l'allodynie mécanique des souris invalidées porteuses d'une tumeur osseuse se situe au niveau des souris cancéreuses de type sauvage (Figure 16B). Malgré les effets analgésiques observés au von Frey, les souris cancéreuses traitées avec le JMV-431 ou invalidées pour le récepteur NTS2, aucune amélioration de l'inconfort ambulatoire n'est notée pour les deux conditions (Figure 16C et D). Par contre, une diminution du poids de $47 \pm 11\%$ sur la patte arrière ipsilatérale des souris cancéreuses invalidées pour le récepteur NTS2 est détectée au jour 3 (Figure 16D). Pour ce qui est de la douleur induite par le mouvement forcé, le JMV-431 améliore cette douleur entre les jours 11 et 18 jusqu'à une réduction maximale de $98 \pm 20\%$ (Figure 16E). Les souris invalidées pour le récepteur NTS2 expriment moins de douleur induite par le mouvement seulement aux jours 11 ($25 \pm 1\%$) et 14 ($42 \pm 9\%$) (Figure 16F).

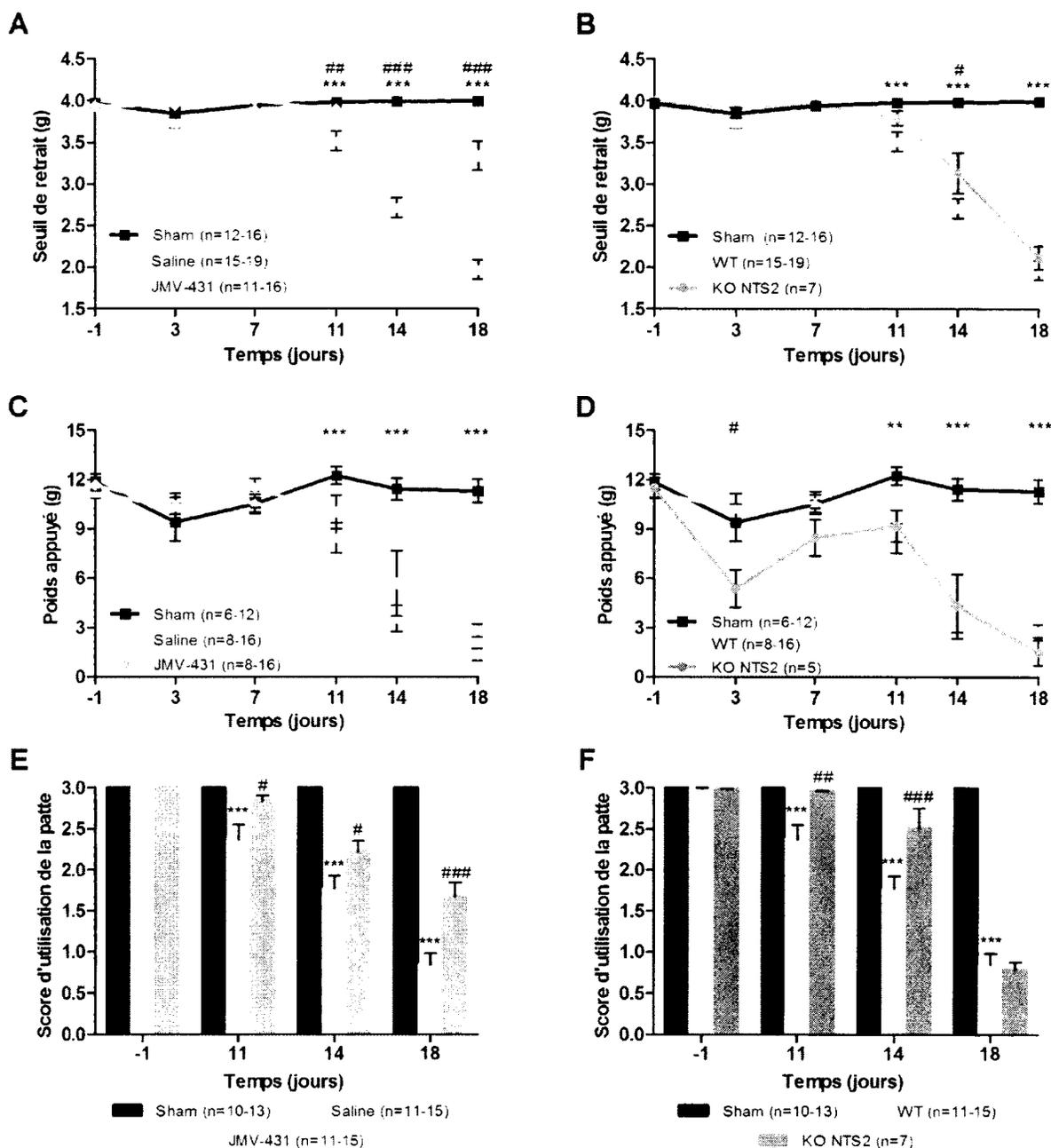


Figure 16. Impact du JMV-431 et de l'invalidation de NTS2 sur la douleur cancéreuse osseuse.

Au von Frey, (A) l'injection i.t. de JMV-431 a diminué l'allodynie mécanique chez les souris cancéreuses entre les jours 11 et 18 et (B) l'invalidation de NTS2 ne bloque pas le développement d'allodynie chez les souris KO NTS2 porteuses d'un cancer osseux. Au DWB, aucune différence n'a été observée (C) entre les souris cancéreuses saline et les souris traitées au JMV-431 et (D) entre les souris WT ayant un cancer et les souris

cancéreuses KO NTS2. Au Rotarod, la douleur induite par le mouvement a été (E) réduite au traitement avec le JMV-431 aux jours 11 à 18 chez les souris atteintes d'un cancer osseux et (F) aussi chez les souris cancéreuses KO NTS2 aux jours 14 et 18.

** P < 0.01; *** P < 0.001 comparé aux souris sham

P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.001 comparé aux souris ayant un cancer osseux traitées avec de la saline ou aux souris WT

Modification de l'activité neuronale spinale par le JMV-431 et du PD149163

Au jour 18 post-chirurgie, les souris développant un cancer osseux traitées avec le JMV-431 ont exprimé moins de neurones positifs pour le gène *C-fos* au niveau des lamina V à VII du côté ipsilatéral, soit une diminution de l'activité neuronale de $61 \pm 5\%$ comparativement au souris contrôles (Figure 17A). Pour ce qui est des souris cancéreuses traitées avec le PD149163, aucune différence d'activité neuronale n'a été observé du côté ipsilatéral par rapport aux souris traitées avec de la saline (Figure 17A). Du côté controlatéral, aucun traitement n'a réussi à modifier l'activité neuronale de base chez les souris ayant un cancer osseux (Figure 17B).

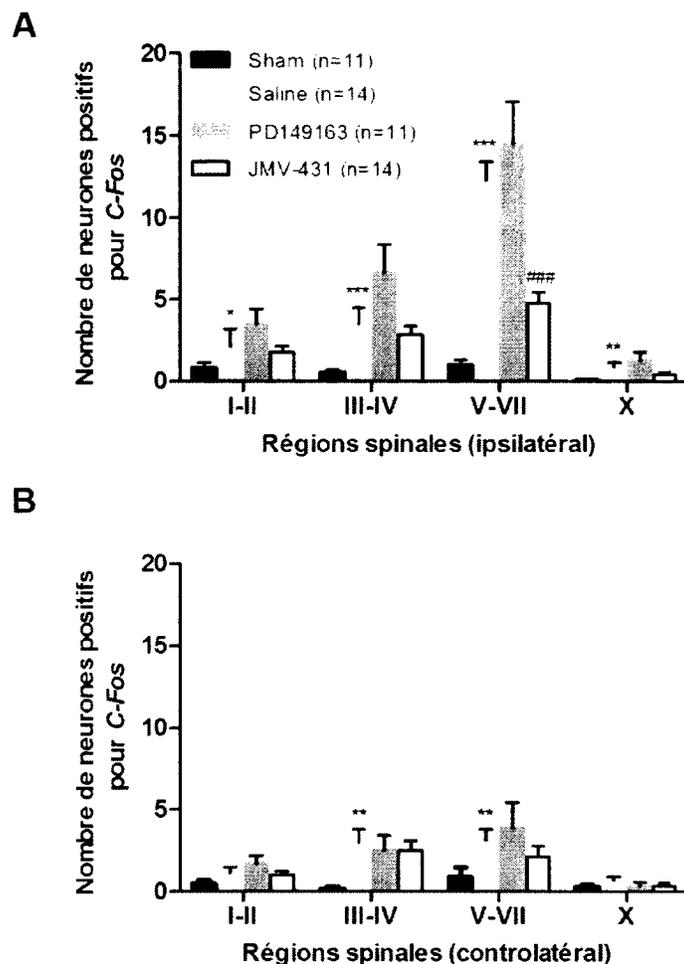


Figure 17. Changement de l'activité neuronale suite à l'injection de PD149163 et de JMV-431.

Les données représentent la moyenne \pm SEM du décompte de neurones positifs pour le gène *C-fos* au niveau des lamina I-II, III-IV, V-VI et X du segment L1-L3 de la moelle épinière au jour 18. (A) Du côté ipsilatéral, l'activité neuronale est augmentée chez les souris cancéreuses traitées avec de la saline et ce au niveau de toutes les lamina. L'injection i.t. de JMV-431, et non de PD149163, a diminué cette activité, mais exclusivement dans les lamina V à VII (B) Du côté controlatéral, aucun agoniste n'est parvenu à modifier le niveau d'activité neuronale mesuré chez les souris cancéreuses contrôles.

* < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001 comparé aux souris sham

< 0.001 comparé aux souris ayant une tumeur osseuse traitées avec de la saline

AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE

Titre de l'article

Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity.

Auteurs

Geneviève Roussy, Marc-André Dansereau, Stéphanie Baudisson, Faouzi Ezzoubaa, Karine Belleville, Nicolas Beaudet, Jean Martinez, Elliott Richelson et Philippe Sarret.

Status de l'article

Publié (*Molecular Pain*. 2009 Jul 6; 5 : 38)

Avant-propos

Ma participation aux expérimentations ayant mené à l'écriture de ce papier comprend tous les tests comportementaux (figures 1 à 4) et l'immunohistochimie (figures 5 et 6). Suite à mes expérimentations et mes analyses des résultats, j'ai participé de façon significative et majoritaire à l'écriture de toutes les parties constituant l'article. Mon implication importante dans cette publication me confère donc le titre de première auteure pour cet article paru dans le journal *Molecular Pain*.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Suite à différentes expérimentations avec des agonistes et antagonistes neurotensinergiques et l'utilisation de souris invalidées pour un des récepteurs de la neurotensine (NT), il a été mis en évidence que l'effet analgésique de la NT était lié à l'activation de plusieurs sous-types de récepteur. Jusqu'à maintenant, les études de douleur aiguë et tonique ont démontré le rôle du récepteur NTS1 dans l'analgésie induite par la NT. Puisque le récepteur NTS2 est exprimé dans les régions du système nerveux central impliquées dans le contrôle de la douleur et que la NT peut produire des effets analgésiques en douleur aiguë via ce récepteur, l'objectif de ce travail était de déterminer si l'activation de NTS2 conduit à la diminution de la douleur tonique et ce à l'aide du test à la formaline. L'injection intrathécale de NT et NT69L, deux molécules non-sélectives, ainsi que le JMV-431 et la lévocabastine, deux agonistes sélectifs pour NTS2, a diminué la douleur induite par la formaline intraplantaire. Cette diminution de la douleur s'est principalement produite dans la phase II, dite inflammatoire, du test à la formaline. Suite à la décortication des comportements douloureux suivant l'injection des différents agonistes, il a été possible de noter qu'en phase II, le NT69L affecte les comportements spinaux et supraspinaux tandis que les deux agonistes sélectifs pour NTS2 ne parviennent qu'à réduire les comportements spinaux. Les effets analgésiques au test à la formaline du JMV-431 et de la lévocabastine se sont traduits par une diminution de l'activité neuronale spinale dans toutes les laminae étudiées du côté ipsilatéral et controlatéral. En résumé, cette étude a permis d'illustrer le rôle de NTS2 dans la modulation spinale de la douleur tonique.

ARTICLE PUBLIÉ

Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity

**Geneviève Roussy¹, Marc-André Dansereau¹, Stéphanie Baudisson¹, Faouzi Ezzoubaa²
Karine Belleville¹, Nicolas Beaudet¹, Jean Martinez³, Elliott Richelson² and Philippe Sarret^{1,#}**

¹ Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

² Department of Psychiatry and Psychology, Mayo Clinic College of Medicine, Jacksonville, FL 32224, USA.

³ CNRS UMR 5247, IBMM, Universités Montpellier 1 & 2, 34095 Montpellier, France.

Corresponding author:

Philippe Sarret, Ph.D
Department of Physiology and Biophysics
Faculty of Medicine and Health Sciences,
University of Sherbrooke
3001, 12th Avenue North
Sherbrooke, Quebec, J1H 5N4
Canada
Tel : (819) 820-6868, ext :12554
Fax : (819) 820-6887
Email : Philippe.Sarret@USherbrooke.ca

ABSTRACT

Background. Central neurotensin (NT) administration results in a naloxone-insensitive antinociceptive response in animal models of acute and persistent pain. Both NTS1 and NTS2 receptors were shown to be required for different aspects of NT-induced analgesia. We recently demonstrated that NTS2 receptors were extensively associated with ascending nociceptive pathways, both at the level of the dorsal root ganglia and of the spinal dorsal horn. Then, we found that spinally administered NTS2-selective agonists induced dose-dependent antinociceptive responses in the acute tail-flick test. In the present study, we therefore investigated whether activation of spinal NTS2 receptors suppressed the persistent inflammatory pain symptoms observed after intraplantar injection of formalin.

Results. We first demonstrated that spinally administered NT and NT69L agonists, which bind to both NTS1 and NTS2 receptors, significantly reduced pain-evoked responses during the inflammatory phase of the formalin test. Accordingly, pretreatment with the NTS2-selective analogs JMV-431 and levocabastine was effective in inhibiting the aversive behaviors induced by formalin. With resolution at the single-cell level, we also found that activation of spinal NTS2 receptors reduced formalin-induced *c-fos* expression in dorsal horn neurons. However, our results also suggest that NTS2-selective agonists and NTS1/NTS2 mixed compounds differently modulated the early (21-39 min) and late (40-60 min) tonic phase 2 and recruited endogenous pain inhibitory mechanisms integrated at different levels of the central nervous system. Indeed, while non-selective drugs suppressed pain-related behaviors activity in both part of phase 2, intrathecal injection of NTS2-selective agonists was only efficient in reducing pain during the late phase 2. Furthermore, assessment of the stereotypic pain behaviors of lifting, shaking, licking and biting to formalin also revealed that unlike non-discriminative NTS1/NTS2 analogs reversing all nociceptive endpoint behaviors, pure NTS2 agonists specifically inhibited paw lifting, supporting a role of NTS2 in spinal modulation of persistent nociception.

Conclusion. The present study provides the first demonstration that activation of NTS2 receptors produces analgesia in the persistent inflammatory pain model of formalin. The dichotomy between these two classes of compounds also indicates that both NTS1 and NTS2

receptors are involved in tonic pain inhibition and implies that these two NT receptors modulate the pain-induced behavioral responses by acting on distinct spinal and/or supraspinal neural circuits. In conclusion, development of NT agonists targeting both NTS1 and NTS2 receptors could be useful for chronic pain management.

BACKGROUND

Endogenous neurotensin (NT) as well as centrally administered NT analogs produce dose-dependent analgesic effects in either somatic or visceral pain paradigms (Dobner, 2006). Site-specific microinjections of NT also result in a mu-opioid receptor-independent antinociceptive response in the hot-plate and acetic acid-induced writhing tests in rodents (al-Rodhan *et al.*, 1991; Behbehani et Pert, 1984; Clineschmidt *et al.*, 1979; Nemeroff *et al.*, 1979; Osbahr *et al.*, 1981). Molecular cloning and pharmacological data have demonstrated the existence of at least three subtypes of NT receptors referred to as NTS1, NTS2, and NTS3 (Mazella, 2001; Mazella et Vincent, 2006; Vincent *et al.*, 1999). However, there is now evidence that the analgesic action of NT is mediated through activation of both G-protein coupled receptors, NTS1 and NTS2 (Dobner, 2005, 2006; Sarret et Beaudet, 2003; Sarret *et al.*, 2007).

Originally, several studies pointed to the levocabastine-sensitive low-affinity NTS2 subtype as a major NT antinociceptor. The earliest indication was that the analgesic effectiveness of a panel of metabolically stable peptide and pseudopeptide analogs of NT did not correlate with their binding affinities for NTS1 (Dubuc *et al.*, 1999c; Labbe-Jullie *et al.*, 1994). Among them, intracerebroventricular (i.c.v.) or intrathecal (i.t.) injection of the NTS2-selective agonist, JMV-431, induced strong antinociceptive responses in acute and visceral pain tests in rodents (Dubuc *et al.*, 1999c; Sarret *et al.*, 2005). Similarly, i.t. or intra-rostroventromedial medulla (RVM) administration of both selective NTS2 analogs, levocabastine and β -lactotensin engendered analgesia in rats, as measured in the tail-flick test (Buhler *et al.*, 2005; Buhler *et al.*, 2007; Dubuc *et al.*, 1999a; Sarret *et al.*, 2005; Yamauchi *et al.*, 2003). Furthermore, i.c.v. administration of the NT antagonist SR142948A, which recognizes both high- and low-affinity NT sites, blocked NT-induced analgesia, whereas the relative selective NTS1 antagonist SR48692 did not (Dubuc *et al.*, 1994; Gully *et al.*, 1993; Gully *et al.*, 1997; Labbe-Jullie *et al.*, 1994). The contribution of NTS2 in regulating nociceptive processes was further demonstrated by knockdown of the target protein by antisense approaches. Indeed, sustained delivery of antisense oligodeoxynucleotides (ODN) directed against NTS2 to the brain, or spinal administration

of selective NTS2 dicer-substrate small interfering RNA (siRNA), markedly reduced NT-induced antinociception (Dore-Savard *et al.*, 2008; Dubuc *et al.*, 1999c; Yamauchi *et al.*, 2003). Accordingly, the generation of NTS2-deficient mice confirmed the involvement of this receptor in pain processing (Maeno *et al.*, 2004). NTS2 receptors are also well positioned to modulate nociception at several different levels. Thus, *in situ* hybridization, autoradiographic binding, and immunohistochemical studies have revealed the presence of NTS2 receptors in cerebral regions implicated in the descending control of nociceptive inputs such as the periaqueductal gray (PAG), nuclei raphe magnus, dorsalis, pallidus, and gigantocellular pars alpha (Asselin *et al.*, 2001; Betancur *et al.*, 1998; Lepee-Lorgeoux *et al.*, 1999; Sarret *et al.*, 1998; Sarret *et al.*, 2003b; Schotte et Laduron, 1987; Schotte *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1998). Consistent with a role for NTS2 receptors in the mediation of NT's spinal antinociceptive actions, high levels of NTS2 immunolabeling were observed within dorsal root ganglion cells and their central afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn, as well as in postsynaptic elements throughout the dorsal horn of the rat spinal cord (Sarret *et al.*, 2005).

NT also exerts its central analgesic effects by acting at NTS1 sites. Intra-RVM injection of the selective-NTS1 receptor agonist PD149163 produces dose-dependent thermal antinociception that is blocked by the NTS1 antagonist SR48692 (Buhler *et al.*, 2005; Buhler *et al.*, 2007). Receptor knockout and knockdown strategies support the pharmacological data. Mice deficient in or lacking the NTS1 receptor fail to exhibit NT-induced antinociception to thermal stimuli (Pettibone *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 1998b). The presence of high levels of NTS1 mRNA and proteins in regions implicated in pain regulation such as the RVM, PAG, lumbar dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord neurons also suggests the role of NTS1 in nociceptive modulation (Boudin *et al.*, 1996; Buhler *et al.*, 2005; Fassio *et al.*, 2000; Roussy *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1995). Accordingly, we recently demonstrated that i.t. NTS1 agonists significantly reverse the formalin-induced nociceptive behaviors, providing the first demonstration for a direct involvement of NTS1 receptors in NT-induced analgesia in a model of persistent pain (Roussy *et al.*, 2008). There is, however, substantial evidence that receptors different from NTS1 also regulate nociceptive signaling in a formalin tonic pain model. The involvement of additional receptors is indeed suggested by the finding that the reversal by SR48692 of

the antinociception produced by PD149163 was more complete than of that induced by NT69L, a peptidase resistant NT analog which binds to both NTS1 and NTS2 receptors with high affinity, but in a non-selective manner (Roussy *et al.*, 2008).

The aim of the present study was, therefore, to evaluate the potential implication of NTS2 receptors in persistent pain. To test this possibility, antinociception produced by spinal administration of selective NTS2 agonists was assessed in rats receiving intraplantar formalin into the right hind paw. Expression of the transcription factor *c-fos* is used as a functional marker to identify the spinal neurons that are activated by different forms of noxious stimulation. We then investigated whether i.t. NTS2 agonists suppressed formalin-evoked *c-fos* protein-like immunoreactivity in the rat lumbar spinal cord.

MATERIAL and METHODS

Cell culture

The human embryonic kidney (HEK 293) cell line stably expressing either rNTS1 or rNTS2 were cultured in 175 cm² tissue culture flasks at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 2 mM L-glutamine. The medium was supplemented with 5% fetal bovine serum, 0.1 mM nonessential amino acid, 1 U/ml penicillin and 1 mg/ml Geneticin (G418), in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂. Cells were fed every 2 days with 20 ml of medium. 70-80% confluent HEK 293 cells were washed twice with phosphate-buffered saline solution, scraped into 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 1 mM EDTA and 250 mM sucrose and centrifuged at 15,000 g for 12 min at 4°C. Pellets were then re-suspended in hypotonic TE buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 1 mM EDTA) and membrane homogenates were recovered by centrifugation for 30 min at 4°C. The final protein concentration was determined with the use of the BCA assay kit (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL).

Radioligand Binding Studies

For competition binding experiments, cell membranes (20 µg per assay for rNTS1 and 100 µg per assay for rNTS2) were incubated with 2 nM [³H]-NT for 45 min at 37°C in the binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 40 µg/ml bacitracin, and 1% bovine serum albumin), in the presence of increasing concentrations (from 10⁻¹¹ to 10⁻⁵) of NT, NT69L (synthesized by E. Richelson), levocabastine (kindly provided by Janssen Research, Beerse, Belgium) and JMV-431 (synthesized by J. Martinez). Binding was terminated by two successive additions of 3 ml of ice-cold buffer and filtering under vacuum through GF/B filters presoaked in binding buffer containing 0.2% polyethyleneimine (48-well Brandel Harvester). Filters were placed in scintillation vials containing 5 ml scintillation liquid (Ecolite) and then counted in a beta counter. Specific binding was calculated as the difference between total binding (zero competing compound) and nonspecific binding (excess competing compound) and the IC₅₀ values were determined from inhibition curves as the unlabeled ligand concentration inhibiting 50% of

[³H]-NT-specific binding. Data were analyzed by LIGAND (Munson et Rodbard, 1980) and represented as geometric means, with the standard error of the geometric mean being calculated as described in (De Lean *et al.*, 1982).

Animals, housing and habituation

Experiments were performed with adult male Sprague-Dawley rats (250-300g; Charles River, St-Constant, QC, Canada) kept on a 12h light/dark cycle and allowed *ad libitum* access to food and water. Animals were individually acclimatized to Plexiglas enclosures for 3 consecutive days prior to testing. The formalin test was always performed by three different experimenters in a quiet room and between 08.00 AM and 12.00 PM to reduce any variation related to circadian rhythm. The experimental procedures in this study were approved by the Animal Care Committee of the University of Sherbrooke and were in accordance with policies and directives of the Canadian Council on Animal Care.

Behavioral studies

Intrathecal administration of NTS2 agonists before formalin injection

Behavioral experiments aimed at establishing the effects of NT analogs and NTS2-selective agonists on formalin-induced nocifensive behaviors. To this end, rats were lightly anesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada) and injected intrathecally, at the L5-L6 intervertebral space, with either NT (6 µg/kg), NT69L (5 µg/kg), JMV-431 (5 to 60 µg/kg), or levocabastine (0.5 and 5 µg/kg) diluted in 30 µl of physiological saline (0.9% NaCl), 5 min before formalin administration. Control animals received physiological saline.

Formalin test: Antinociception was assessed using the formalin test as a model of persistent pain. For this purpose, rats were placed for a 60-min habituation period in the experimentation room. Thereafter, rats received a 50 µl subcutaneous injection of diluted 2% formaldehyde (i.e. 5% formalin, Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) into the plantar surface of the right hind paw.

Following this, the rats were placed in clear plastic chambers (30X30X30 cm) positioned over a mirror angled at 45°, in order to allow an unobstructed view of the paws, and their behaviors were recorded for the next 60 min. An intraplantar injection of formalin produced the biphasic nociceptive response typical of this tonic pain model (Sawynok et Liu, 2004). The two distinct phases of spontaneous pain behaviors that occur in rats are proposed to reflect a direct effect of formalin on sensory receptors (phase 1) and a longer lasting pain due to inflammation and central sensitization (phase 2). Nocifensive behaviors were assessed using a weighed score as described previously (Coderre *et al.*, 1993; Dubuisson et Dennis, 1977). A nociceptive mean score was determined for each 3 min period during the recording time by measuring the amount of time spent in each of four behavioral categories: 0, the injected paw is comparable to the contralateral paw; 1, the injected paw has little or no weight placed on it; 2, the injected paw is elevated and is not in contact with any surface; 3, the injected paw is licked, bitten, or shaken. The weighted nociceptive score, ranging from 0 to 3, is calculated by multiplying the time spent in each category by its assigned weight category, summing these products and dividing by the total time for each 3 min block of time. The total area under the curve (A.U.C.) for the inflammatory phase (phase 2) was calculated between 21 to 60 min for each animal. Phase 2 was further subdivided in early (21-39 min) and late (40-60) phases and analyzed as separate events (Spooner *et al.*, 2007). Formalin-induced pain related behavior may also be quantified by monitoring the number and the duration of episodes of different behavioral endpoints (Tjolsen *et al.*, 1992). The cumulative time spent in both lifting (state 2) and flinching/licking/biting (state 3), reflecting behavioral reactions integrated at different CNS levels, were also determined during the inflammatory phase (21 to 60 min following formalin) (Sawynok et Liu, 2004).

Statistical analysis: Data are presented as means \pm standard errors of the mean (S.E.M.). All calculations and statistical analysis were performed using Prism 4.0 and Instat 3.05 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Nociceptive scores over the 3 min time blocks were analyzed using a two-way analysis of variance for repeated measures, with comparisons between experimental groups and the control group at each time interval using

Bonferroni's *post hoc t*-test. A one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc t*-test was used to determine the significance of differences in the A.U.C. and in the time spent in states 2 and 3. A difference in responses between groups was considered significant with *P* values; * *P* < 0.05 and ** *P* < 0.01.

c-fos immunohistochemistry

The immunohistochemical study was restricted to an analysis of the effect of intrathecal pretreatment with either 30 µg/kg of JMV-431, 5 µg/kg levocabastine, or saline on the expression of *c-fos*-like immunoreactivity (*c-fos*-LI) by intraplantar injection of 5% formalin into the right hind paw. At 45 min following formalin injection, rats were deeply anesthetized and perfused intraaortically with ice-cold 4% paraformaldehyde (Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) in 0.1 M PB, pH 7.4. The spinal cord was isolated and then cryoprotected overnight at 4°C in 30% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS). Prior to tissue sectioning, an incision was made in the ventral horn of the contralateral side to allow spatial positioning of the spinal cord for further analysis. Transverse frozen sections (35-µm-thick) were then cut from the lumbar segment (L4-L5) of the spinal cord with a sliding microtome and processed by a free-floating slice immunohistochemistry procedure. After elimination of endogenous peroxidase activity with 0.3% hydrogen peroxide in PBS for 1 h, the tissue sections were rinsed three times in PBS and incubated for 1 h at RT in a blocking solution of 3% normal goat serum (NGS) and 0.3% Triton X-100 in PBS. After washing, free-floating sections were incubated overnight at RT with the rabbit anti-*c-fos* polyclonal antibody diluted 1:1000 in PBS (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), containing 1% NGS and 0.3% Triton X-100. The tissue was then washed three times in PBS and transferred to a goat anti-rabbit biotinylated secondary IgG complex (1:200 in 1% NGS and 0.3% Triton X-100 in PBS; Vector, Burlingame, CA, USA) for 1 h at RT followed by exposing to avidin-biotin horseradish peroxidase complex (1:100; Vectastain ABC-Elite kit, Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) for 1 h at RT. After the final wash with PBS, the chromagen was developed using nickel intensified 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.01%) and 0.3% H₂O₂. Finally, the

sections were thoroughly rinsed with PBS, mounted onto slides, dehydrated in a series of graded alcohols, defatted in xylene, and placed on coverslips.

Counting of c-fos protein immunoreactive nuclei

The greatest numbers of labeled neurons evoked by formalin were detected at the L4-L5 levels, corresponding to segmental innervation of the rat plantar hind paw (Presley *et al.*, 1990). Sections were visually scanned and photographed using a bright-field microscope (Leica DM4000B; Leica Microsystems, Toronto, Canada). The individual sections were printed and overlaid with an acetate sheet on which the distribution of *c-fos* immunoreactive neurons was then plotted. A neuron was considered to be labeled only if the nucleus showed the characteristic staining of oxidized DAB, and was distinct from background at magnifications of 4x, 10x, and 20x. For the quantification of *c-fos* labeled neurons, each section of the spinal cord was divided into four regions of interest: the superficial laminae (laminae I, Ilo and Ili), the nucleus proprius (laminae III and IV), the neck of the dorsal horn (laminae V and VI) and the deep lamina X according to the cytoarchitectonic organization of the spinal cord (Molander *et al.*, 1984). The number of *c-fos* immunoreactive neurons in the four defined regions was determined by averaging the counts made in 10-15 sections and expressed as mean \pm S.E.M. of these values for all the rats in that treatment group for statistical analysis of the different experimental conditions. One-way analysis of variance (ANOVA) was conducted using computer software (Instat 3.05) for comparison across the experimental conditions considering the number in each defined region. A Dunnett's *t*-test was applied to assess differences between the drug and vehicle groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Competitive Binding Assays

Each NT analog was evaluated in competitive binding assays against the two cloned rat NT receptors, with binding affinities defined as the concentration of peptide required to inhibit 50% of the binding of [³H]-NT to either NTS1 or NTS2 (IC₅₀). The binding activity data in **Table 1** provide interesting information regarding the selectivity of peptidase-resistant NT agonists for NTS2 *versus* NTS1. Thus, the metabolically stable NT(8-13) analog JMV-431, protected at its N-terminus by a Boc group and by a reduced pseudopeptide bond Y (CH₂NH) in position 11-12 binds with 250 times greater affinity to rat NTS2 (IC₅₀ = 19 ± 3 nM) than to rat NTS1 (IC₅₀ = 4735 ± 100 nM). The non-peptide compound levocabastine (IC₅₀ = 3 ± 1 nM) was as potent as unlabeled NT (IC₅₀ = 9 ± 2 nM) in inhibiting [³H]-NT binding to HEK293 cell membranes expressing NTS2. In addition, the NT(8-13) analog NT69L, which contains a *L-neo*-tryptophan amino acid, and exhibits high affinity for both rat (IC₅₀ = 2.2 ± 0.5 nM) and human NTS1 (Cusack *et al.*, 2000) also appeared as a ligand with a good affinity for the rat NTS2 (IC₅₀ = 3.7 ± 0.4 nM). Therefore, JMV-431 and levocabastine were used in the behavioral experiments as selective ligands for NTS2, whereas NT69L and NT were considered as agonists acting on both NTS1 and NTS2 in a non-discriminative manner.

Table1. IC₅₀ values (nM) for NTS1 and NTS2

Compound	Structure	rNTS1	rNTS2
Neurotensin	pyroGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	5.0 ± 0.7	9.0 ± 2
NT69L	<i>N-methyl</i> -Arg-Lys-Pro- <i>L-neo</i> -Trp- <i>tert</i> -Leu-Leu-OH	2.2 ± 0.5	3.7 ± 0.4
JMV-431	Boc-Arg-ArgPro-Tyrψ(CH ₂ NH)-Ile-Leu-OH	4735 ± 135	19 ± 3.2
Levocabastine	non peptidic	> 10,000	2.7 ± 1.3

Binding potencies of NT and related analogs were determined in competition experiments performed with HEK293 cells expressing either NTS1 or NTS2. Data represent means ± SEM of at least three independent experiments carried out in triplicate.

Intrathecal administration of NTS2 agonists reduces formalin-induced persistent spontaneous nociception

Intraplantar injection of formalin into the right hind paw of saline-pretreated rats produced a typical biphasic specific nociceptive behavioral response consisting of an acute phase (0-9 min) followed by a second prolonged inflammatory phase (21-60 min) (Roussy *et al.*, 2008). In the present experiments, we examined the contribution of NTS2 receptors to the tonic late phase of the formalin response by assessing the effects of different agonists of increasing selectivity towards NTS2. Based on previous dose-response and toxicity studies, we chose analgesic doses of NT, NT69L, JMV-431 and levocabastine that were devoid of non-specific motor effects (Dore-Savard *et al.*, 2008; Roussy *et al.*, 2008; Sarret *et al.*, 2005).

Formalin-induced pain related behavior was first quantified by using the weighted scores method described by Dubuisson and Dennis (Dubuisson et Dennis, 1977). Injected intrathecally 5 min before formalin, NT (6 µg/kg; n = 8) and NT69L (5 µg/kg; n= 8), which bind to both NTS1 and NTS2 with a similar affinity, significantly reduced pain-evoked responses during the second phase of the formalin test (Fig. 1A). Specifically, NT and NT69L pretreatment produced $48 \pm 9\%$ and $59 \pm 13\%$ reduction of pain behaviors in the tonic phase compared to vehicle-treated rats, respectively ($P < 0.05-0.01$, Fig. 2A). We then investigated whether spinally administered selective-NTS2 receptor analogs exerted antinociceptive effects following noxious chemical stimulation. As shown in Fig. 1B, injection of different doses of JMV-431 was significantly effective in inhibiting the aversive behaviors induced by formalin. All doses tested markedly attenuated the pain response to formalin during the tonic phase, producing $24 \pm 11\%$ and $45 \pm 18\%$ of inhibition at 5 µg/kg and 30 µg/kg, respectively (n = 8; $P < 0.05-0.01$, Fig. 2A). This reduction remained steady, however, despite the use of higher doses of JMV-431 ($45 \pm 14\%$ of reduction in phase 2 at 60 µg/kg, n= 8; Fig. 1B). Finally, signs of nociception evoked by formalin injection were also reversed by i.t. levocabastine administration (0.5, 5 µg/kg), reaching $29 \pm 5\%$ of inhibition at the highest dose (n = 6, $P < 0.05$; Figs. 1C, 2A).

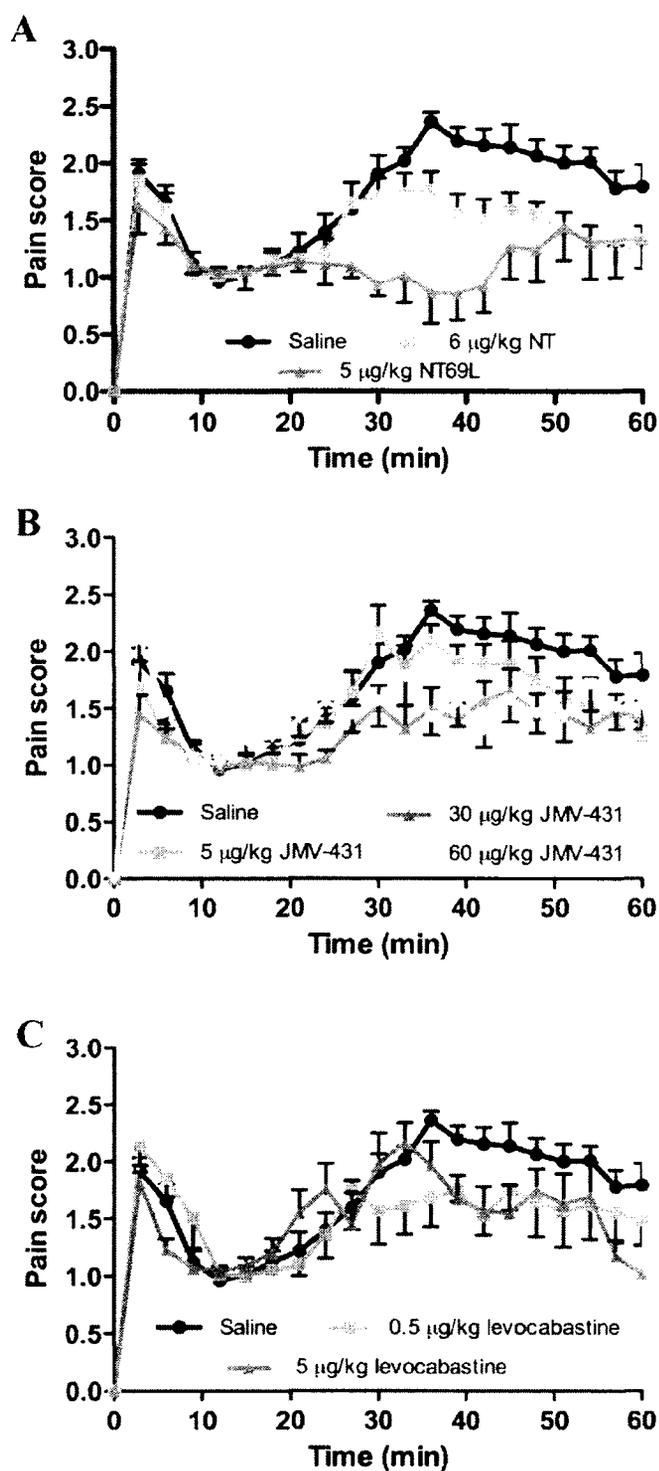


Figure 1. Antinociceptive effects of acute injection of NT agonists on formalin induced pain behaviors. (a) Time course of analgesic effects of NT (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and NT69L (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Saline and drugs were intrathecally administered 5 min before the subcutaneous injection of formalin. Nocifensive behaviors in male rats are expressed in 3 min intervals with a

weighted pain score. **(b, c)** Pre-treatment with JMV-431 (5-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or levocabastine (0.5-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) results in the inhibition of the persistent noxious chemical stimulation. Each symbol represents the mean \pm SEM of determinations made in six to eight animals.

Even if all compounds tested were able to inhibit spinal nociceptive transmission induced by formalin injection, differences in the profile of the inflammatory phase were still observed between each drug. Indeed, the decrease in the pain score of phase 2 determined for both JMV-431 and levocabastine was delayed in time when compared to the NT69L profile (Fig. 1). Therefore, phase 2 was further subdivided into an early phase (21-39 min) succeeding the interphase and into a late one (40-60 min) corresponding to the sustained inflammation plateau. For comparative purposes, we evaluated the effects of equi-analgesic doses of exogenous NT agonists in terms of inhibition of phase 2 pain behaviors (Fig. 2). A statistically significant decrease in the A.U.C. was noted for the non-selective NTS1/NTS2 agonist, NT69L in both early and late phases, with a maximal decrease of $70 \pm 13\%$ and $48\% \pm 19\%$ respectively ($P < 0.05-0.01$; Fig. 2B). Interestingly, the same analysis procedure applied to JMV-431 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and levocabastine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) revealed that these two selective NTS2 analogs exclusively reduced the behavioral signs of formalin-induced pain by $48 \pm 18\%$ and $48 \pm 16\%$ respectively in the late phase 2, while they had no effect in the early phase ($P < 0.05$, Fig. 2B). These results suggest that NTS1 and NTS2 agonists may act differently to inhibit the nociceptive processing initiated by the persistent noxious chemical stimulation.

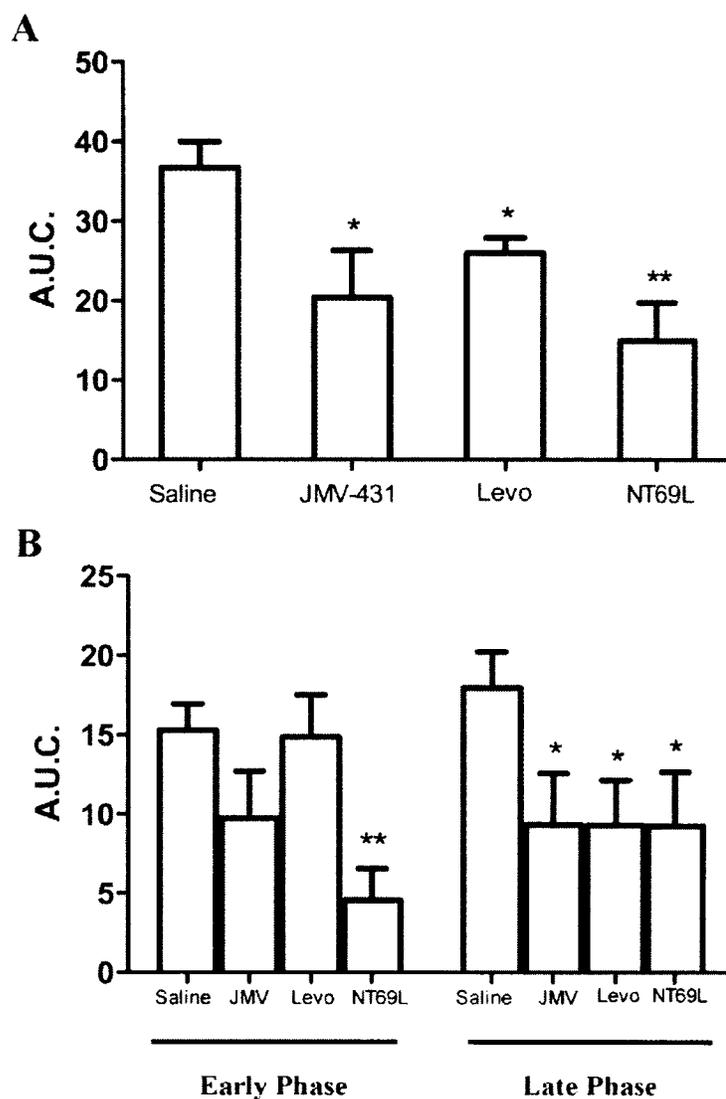


Figure 2. Effects of NT compounds on the formalin-induced nociceptive behavioral responses manifested during the inflammatory phase. **(a)** The antinociceptive response, expressed as mean area under the curve (A.U.C.), is measured during the second phase of the formalin test (21-60 min). Formalin-induced nociceptive behaviors are reduced by i.t. administration of levocabastine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), JMV-431 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and NT69L (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in comparison to control rats receiving saline injection. **(b)** Dissociation of phase 2 in early (21-39 min) and late (40-60 min) phases. JMV-431, levocabastine, and NT69L significantly suppressed the tonic pain response in the late phase, but only NT69L was able to induce analgesia in early phase. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared with the vehicle-treated group (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test). Data are represented as the average \pm SEM.

Effects of intrathecal administration of NTS2 agonists on spinal and supraspinal behaviors induced by formalin

Pain-related behaviors elicited by formalin injection may also be quantified by monitoring the duration of episodes of different behavioral endpoints (Tjolsen *et al.*, 1992). Such lifting, flinching, licking or biting specific behavioral responses are integrated at different central nervous system levels upon persistent nociception, involving the activity of spinal and/or supraspinal nociceptive circuits (Porro et Cavazzuti, 1993; Porro *et al.*, 2003; Vanegas et Schaible, 2004). By focusing on the inflammatory phase, we then evaluated the effects of i.t. pretreatment with NT agonists on the stereotypic behavior reactions to formalin (Fig. 3). At all doses tested, both selective NTS2 agonists JMV-431 and levocabastine markedly decreased the cumulative time spent in lifting, reaching $71 \pm 7\%$ and $73 \pm 5\%$ of inhibition, respectively ($P < 0.05-0.01$; Figs. 3A, B). In contrast to the effects on lifting, none of the doses of either JMV-431 or levocabastine had a significant effect on formalin-induced flinching, licking and biting responses, pointing out the role of NTS2 in spinal modulation of persistent nociception (Figs. 3C, D).

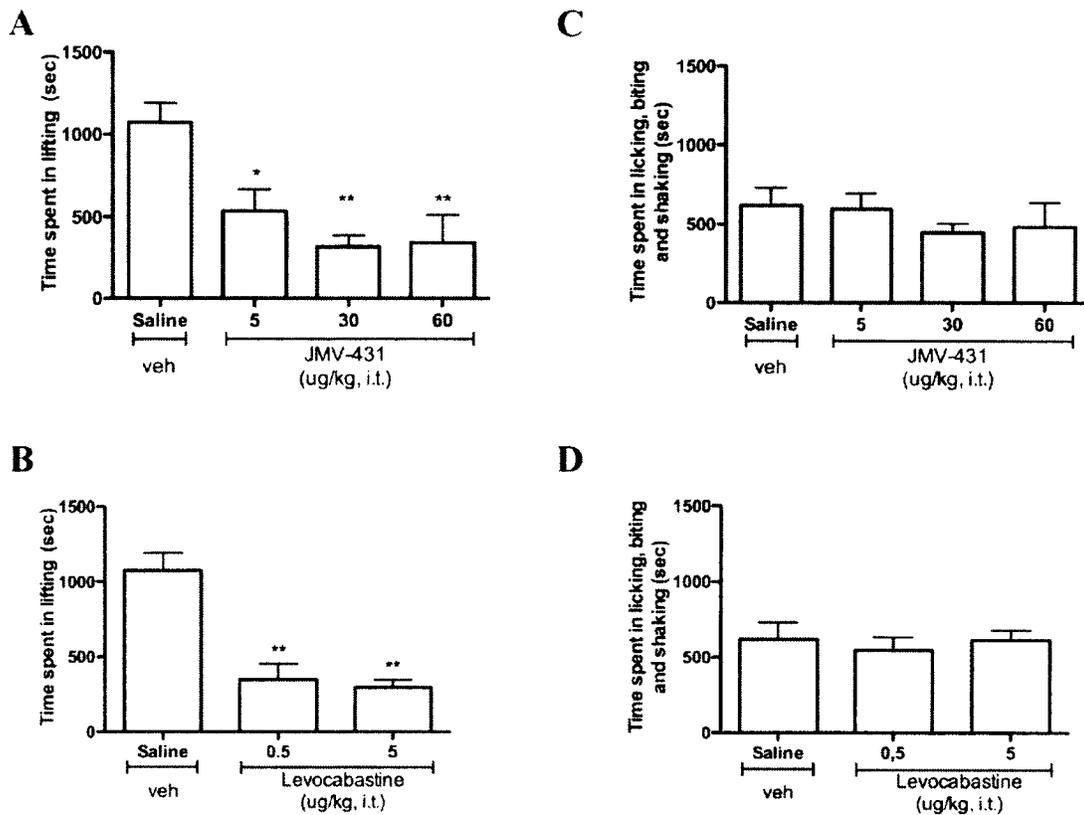


Figure 3. Effects of NTS2 selective agonists on stereotypic behavior reactions to formalin. The cumulative nociceptive response time of lifting, licking, shaking and biting the injected paw was measured during the second phase (21-60 min). Both NTS2 agonists JMV-431 (**a**, **b**) and levocabastine (**c**, **d**) significantly reduce phase 2 lifting but do not reverse formalin-evoked licking/shaking/biting behaviors. The vertical bars denote SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared with the saline-treated group (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

Interestingly, the non-discriminative agonist NT69L had a different action profile in reversing the spontaneous aversive behaviors (Fig. 4). Thus, NT69L significantly reduced by $74 \pm 13\%$ the lifting time elicited by formalin during the tonic phase ($P < 0.001$; Fig. 4A). However, this peptide was also effective in attenuating the flinching, licking and biting responses ($70 \pm 15\%$ maximum antagonism, $P < 0.01$; Fig. 4B), indicating that this NT analog affects both spinally and supraspinally processed pain-related behaviors.

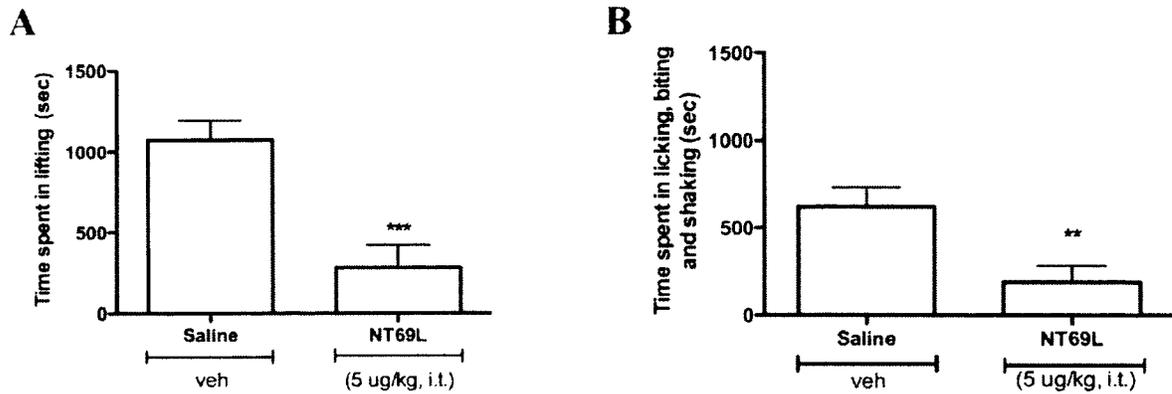


Figure 4. Antinociceptive response to NT69L in the formalin tonic pain model. Intrathecal administration of the non-discriminative NTS1-NTS2 agonist, NT69L significantly blocks phase 2 lifting (a) but also abolishes the other specific behavioral (b) observed during the inflammatory phase. Values represent means \pm SEM. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when compared with the vehicle-treated group (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

Effects of intrathecal pretreatment with NTS2 agonists on formalin-evoked c-fos-like immunoreactivity in spinal cord

The expression of the immediate early gene *c-fos* and of *c-fos* protein in the spinal cord dorsal horn constitutes a marker of neuronal activity that can be induced by noxious stimuli (Hunt *et al.*, 1987). Thus, *c-fos* immunohistochemistry was performed on lumbar spinal dorsal horn sections to characterize at the cellular level the relationship between the pain-relieving effect of NTS2 agonists and the biochemical changes of spinal nociceptive transmission (Figs. 5, 6). As previously documented (Presley *et al.*, 1990), tonic noxious chemical stimulus produced by unilateral subcutaneous formalin injection evokes *c-fos* expression in spinal cord neurons (Fig. 5A). The pattern of nuclear *c-fos*-like immunoreactivity (*c-fos*-LI) was consistent with the known nociceptive primary afferent input from the hindpaw. Indeed, dense labeling was detected, at the L4-L5 segmental levels, principally in neurons located in the superficial dorsal horn (laminae I and IIo) and in the neck of the dorsal horn (laminae V and VI). A scattered staining was also recorded in the nucleus proprius (laminae III and IV), a region that predominantly contains cells only responsive to innocuous stimulation. As described previously (Menetrey *et al.*, 1989;

Roussy *et al.*, 2008), only few labeled neurons were present in both sides of the spinal cord of non-stimulated rats (i.e. without formalin injection; Fig. 6).

We then evaluated the ability of JMV-431 and levocabastine to suppress formalin-induced *c-fos* protein expression. Spinal administration of JMV-431 markedly decreased formalin-evoked *c-fos*-LI in all laminae (Fig 5B). At a dose of 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, injection of JMV-431 reduced the number of *c-fos*-LI neurons in the ipsilateral laminae I-II, laminae III-IV and laminae V-VI by $31 \pm 7\%$, $36 \pm 5\%$ and $37 \pm 5\%$, respectively ($P < 0.001$ compared with control group; i.e rats receiving i.t. saline and formalin injection; $n = 4$) (Fig 6A). Accordingly, treatment with the other NTS2 agonist, levocabastine also reversed the activation of medullary neurons after the formalin-induced inflammation (Fig. 5C).

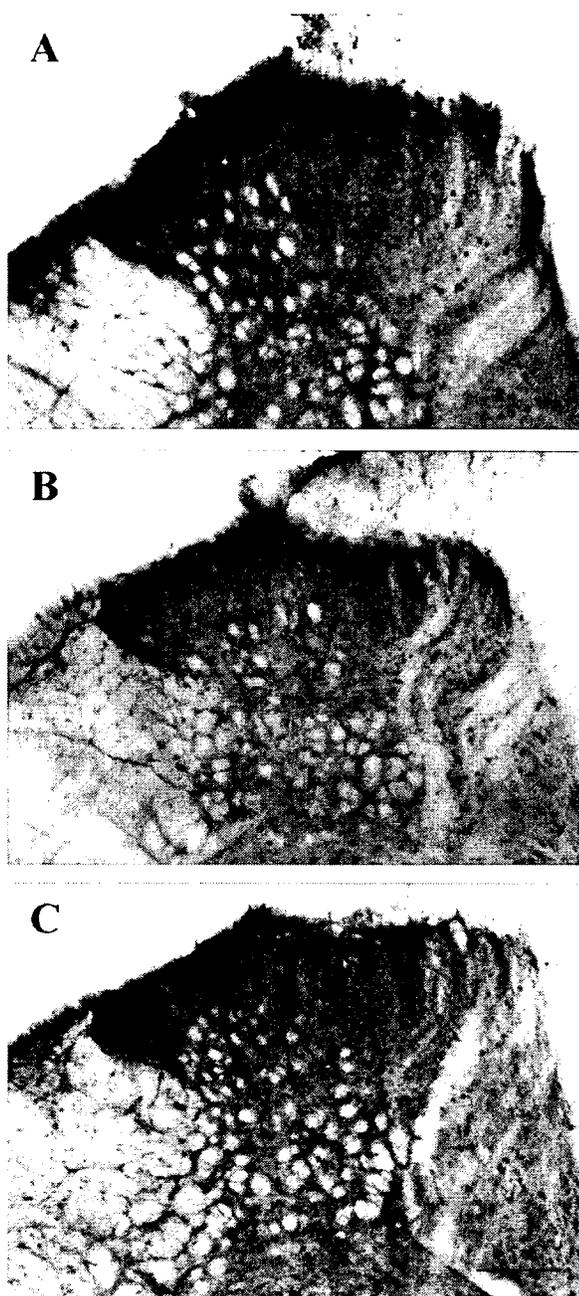


Figure 5. *C-fos*-like immunoreactivity at the L4-L5 spinal segment ipsilateral to the hindpaw injection of formalin in ipsilateral lumbar sections of the dorsal horn of the spinal cord. Three different situations are represented (all animals were injected with formalin): control rats that received saline (**a**) and rat receiving either JMV-431 (**b**) or levocabastine (**c**). Note that both JMV-431 and levocabastine reduced the level of formalin-evoked *c-fos* expression in the superficial dorsal horn. Scale bar: 200 μm .

Quantitative analysis revealed that *c-fos*-LI neurons in ipsilateral laminae I-II, laminae III-IV, laminae V-VI and laminae X were reduced by $26 \pm 7\%$, $60 \pm 5\%$, $53 \pm 3\%$ and $56 \pm 8\%$, respectively, following administration of levocabastine ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$; $P < 0.05 - 0.001$ compared with control group; $n = 4$) (Fig 6A). The non-selective agonist NT69L also attenuated the spinal nociceptive neuronal responses induced by formalin injection (not shown). The number of *c-fos*-LI neurons evoked by formalin in the superficial layers, the nucleus proprius, and the neck of the dorsal horn of the ipsilateral side was greater than that in the contralateral area. Both NTS2 agonists were, however, efficient to bilaterally counteract formalin-induced neuronal activation (Fig. 6B). The contralateral immunoreactivity of *c-fos* was reduced by pre-treatment with either JMV-431 (laminae I-II ($45 \pm 7\%$), laminae III-IV ($23 \pm 4\%$) and laminae V-VI ($42 \pm 4\%$); $P < 0.05 - 0.001$ versus control group; $n = 3$) or levocabastine ($74 \pm 7\%$, $72 \pm 7\%$, $77 \pm 5\%$ and $98 \pm 1\%$ of reduction in laminae I-II, laminae III-IV, laminae V-VI and lamina X, respectively; $P < 0.001$ versus control group; $n = 3$).

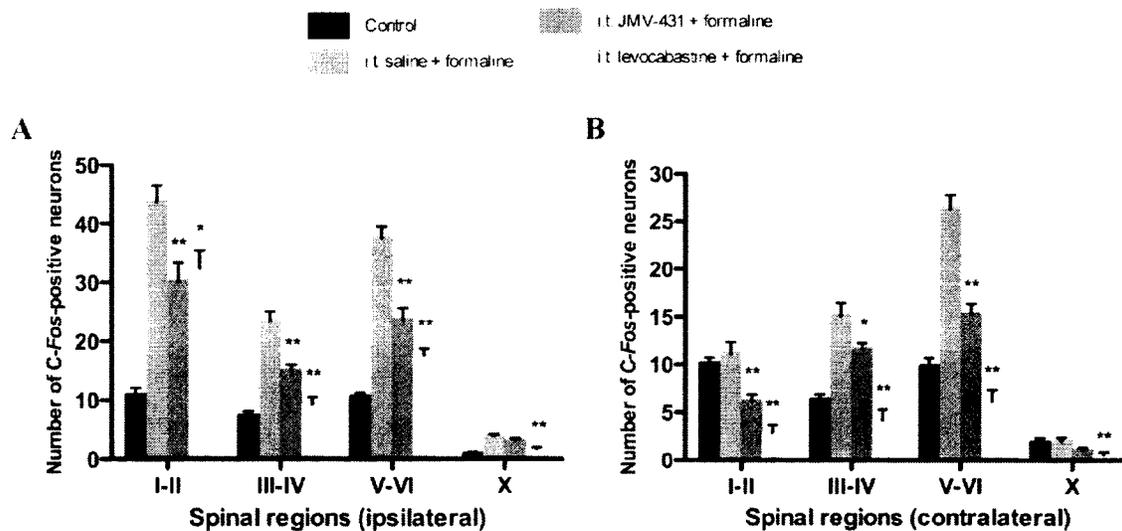


Figure 6. Regional analysis of the effects of NTS2 agonist administration on formalin-induced *c-fos* expression in spinal cord. Data represent the mean \pm SEM of *c-fos*-positive neurons in the superficial laminae (laminae I-II), nucleus proprius (laminae III-IV), neck of the dorsal horn (laminae V-VI), and lamina X of the L4-L5 segments, both ipsilateral (a) and contralateral (b) to formalin injection. Formalin increased *c-fos* expression in rats pretreated with saline compared to that for naïve rats. JMV-431 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$) and

levocabastine (5 µg/kg) reduced the number of *c-fos* positive neurons in laminae I-II, III-IV and V-VI on the ipsilateral side. Both NTS2 agonists also reversed the spinal neuronal activity observed contralaterally. Statistical analysis between saline and agonist-treated groups: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$; ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

DISCUSSION

The majority of studies on pain processing have used, as a behavioral model of pain, the withdrawal reflex threshold of a limb provoked by a brief noxious stimulus, usually thermal, mechanical, or electrical. Although such traditional nociceptive tests have considerably improved our knowledge of pain mechanisms, the relevance of these models for understanding activity in chronic pain states is somehow limited. Indeed, pain associated with injury and disease is long lasting and frequently associated with inflammation and psychological distress. The molecular and cellular changes observed in nociceptive modulatory circuits provide evidence of this complex functional reorganization occurring in the presence of persistent pain (May, 2008; Salter, 2005). Furthermore, there is a clear indication that suppression of phasic and tonic pain can involve distinct mechanisms (Ryan *et al.*, 1985; Wheeler-Aceto *et al.*, 1990). In this regard, the formalin test was developed as a model of tonic pain that has a greater relevance to clinical pain than an acute phasic pain test (Sawynok et Liu, 2004; Tjolsen *et al.*, 1992). The local injection of formalin into the hindpaw produces a characteristic biphasic behavioral response (Dubuisson et Dennis, 1977; Wheeler-Aceto et Cowan, 1991). The first phase of activity reflects a direct activation of sensory afferents and may thus be of limited value in understanding mechanisms involved in persistent pain. A particular focus of the present study was therefore on the second phase, which corresponds to ongoing peripheral activity and involves central sensitization (Coderre *et al.*, 1993; Sawynok et Liu, 2004).

We have recently implicated NTS1 receptors in NT's analgesic effects in tonic spinal pain paradigms (Roussy *et al.*, 2008). However, the experiments performed with the selective NTS1 antagonist SR48692 have suggested that another NT receptor may participate to the regulation of pain signaling, SR48692 partly reversing the analgesic effects of the non-discriminative agonist NT69L. To our knowledge, the present investigation demonstrates for the first time that NTS2 agonists given intrathecally produce antinociception in the formalin model of persistent inflammatory pain (Fig. 1). These results are in agreement with previous studies suggesting that NTS2 receptors play a role in the regulation of spinal nociceptive inputs. Thus, administration of the selective NTS2 agonists, JMV-431 and levocabastine,

into the subarachnoid space of the lumbar spinal region elicited analgesia in the tail-flick test (Dore-Savard *et al.*, 2008; Sarret *et al.*, 2005). The dose effect seen here with levocabastine was previously reported in different acute and tonic pain paradigms (Dubuc *et al.*, 1999a; Sarret *et al.*, 2005). The association of NTS2 receptors with different sub-populations of DRG neurons and their presence within the dorsal horn of the spinal cord also reinforced the involvement of NTS2 receptors in the control of incoming nociceptive messages. Indeed, NTS2 receptors are expressed by substance P- and lectin B4-containing small ganglion cells as well as by large-sized NF200-positive neurons documented to carry primary nociceptive sensory modalities and proprioceptive allodynia, respectively (Sarret *et al.*, 2005). A dense plexus of NTS2-immunoreactive neuronal processes and numerous NTS2-expressing nerve cell bodies were also detected in the superficial laminae of the dorsal horn and in deeper layers III-V, suggesting that NTS2 may play an important role in modulating the activity of spinal neurons (Sarret *et al.*, 2005).

Since the introduction of the formalin test, different approaches have been used to assess formalin-induced pain-related behaviors (Porro et Cavazzuti, 1993; Sawynok et Liu, 2004). The initial behavioral scoring in rats involved assigning of weighted scores to different kind of behaviors, the intensity of each nociceptive-related activity being directly correlated in proportion to their category weights (Coderre *et al.*, 1993; Dubuisson et Dennis, 1977). Based on the concept that the different behavioral endpoints represent a one-dimensional view of nociception, this method reflects the overall pain experience of the animal being tested. Using the weighted average pain scores, we found that NTS2-selective agonists and non-discriminative compounds gave rise to different action profiles during the inflammatory phase of the formalin test. Indeed, both JMV-431 and levocabastine had higher nociceptive scores than did NT69L (which binds to both NTS1 and NTS2) during the early phase 2 (21-39 min), while all drugs were efficient in reducing pain during the late phase 2 (40-60 min) (Fig. 2). Accordingly, we recently demonstrated that the selective-NTS1 agonist, PD149163 behaved as NT69L, suppressing pain-related behavioral activity in both early and late parts of phase 2 (Roussy *et al.*, 2008). The decrease in the analgesic efficacy of NTS2-selective agonists observed during the first half of phase 2 may be related to the non-involvement of NTS2 during the early tonic inflammatory responses. This hypothesis is supported by previous findings showing that some receptors involved in the regulation of pain processing

differently modulate the early and late tonic phases 2 (Ray et Yaksh, 2008; Spooner *et al.*, 2007). For example, the synthetic opioid analog, loperamide, only abolishes flinching behaviors in the second part of phase 2 (Ray et Yaksh, 2008). Alternatively, it may also reflect the active participation of NTS2 receptors during the interphase. We could indeed speculate that the endogenous release of NT acting on NTS2 sites during the interphase may reduce or mask the analgesic effects of NTS2 agonists at the beginning of the inflammatory phase. This delay in the antinociceptive effects of NTS2-selective agonists possibly corresponds to the time frame required for functional resensitization of NTS2 receptors. This second hypothesis is reinforced by previous studies showing that the interphase of the formalin test is the result of active endogenous pain-inhibitory mechanisms (Butkevich et Vershinina, 2001; Franklin et Abbott, 1993; Gaumond *et al.*, 2002, 2005; Gaumond *et al.*, 2007; Henry *et al.*, 1999; Omote *et al.*, 1998).

Aside from the weighted-scores technique, pain intensity elicited by formalin injection may also be rated by the assessment of each individual nociceptive behavior, such as the total time the paw is kept elevated from the floor (Abbott *et al.*, 1981; McLaughlin *et al.*, 1990), the number of times the rat flinches in a given time period (Ryan *et al.*, 1985; Wheeler-Aceto et Cowan, 1991), or the time spent licking and biting the injected paw (Sugimoto *et al.*, 1986). A problem which may occur when measuring only one behavior such as lifting is that if a given treatment prevents this behavior, it is considered to produce 100% analgesia, despite the possibility that the rat may still exhibit other characteristic nociceptive behaviors, such as licking and biting (Coderre *et al.*, 1993). However, the advantage of single parameter recordings over the weighted-scores method is that by taking into account the measurement of multiple behaviors, it would be possible to assess nociceptive behaviors in a manner that reflects the multidimensional nature of pain experience (Porro et Cavazzuti, 1993; Sawynok et Liu, 2004; Tjolsen *et al.*, 1992; Wheeler-Aceto et Cowan, 1991). Based on this method of analysis, we demonstrated that NTS2-selective agonists behaved differently over the inflammatory phase than non-discriminative compounds and could therefore influence pain transmission in a distinctive manner. Thus, spinal delivery of JMV-431 and levocabastine significantly attenuated formalin-induced lifting but not licking, biting and shaking responses during the inflammatory phase (Fig. 3). Unlike NTS2 drugs, the NT69L agonist, acting on both NTS1 and NTS2 receptors, was able to reverse all nociceptive endpoint behaviors

observed following tissue injury by intraplantar formalin (Fig. 4). In Sprague-Dawley rats, these stereotypic behavioral reactions to formalin have been used extensively to evaluate analgesic properties of drugs, and different effects on lifting, shaking, licking, and biting have also been observed with other agents (Porro et Cavazzuti, 1993; Tjolsen *et al.*, 1992). Systemic naloxone was indeed shown to increase formalin-induced flinching while simultaneously decreasing licking behavior (Wheeler-Aceto et Cowan, 1993). Furthermore, peripheral injection of NMDA receptor antagonists significantly attenuated formalin-induced lifting, while flinching behavior was not affected (Davidson et Carlton, 1998). This diversity of outcomes observed in the formalin test was also reported with other spinally administered analgesics and antidepressants (Abbott *et al.*, 1995; Sawynok et Reid, 2001). Even so, concerns regarding motor effects influencing formalin behaviors have been expressed. It has been advocated that licking/biting behaviors are subjected to motor influences and stereotypy, whereas flinching (e.g. paw elevations and paw shakes) is a more spontaneous response, being less influenced by other non-nociceptive behavioral changes (e.g. motor) (Sawynok et Liu, 2004; Tjolsen *et al.*, 1992; Wheeler-Aceto et Cowan, 1991). In this study, we focused on doses that produced no observable motor impairment (Spampinato *et al.*, 1988). Consequently, it is unlikely that the suppression of licking/biting behaviors induced by medullary delivery of non-selective NTS1/NTS2 compounds is related to alterations in motor performance.

The differential effects of pure NTS2 agonists in eliciting lifting and biting/licking responses noted here also suggest that these behaviors involve distinct mechanisms or neural circuitry. Accordingly, pain-related behaviors can be associated with distinct brain structures, including spinal, brainstem, and cerebrally mediated responses to nociceptive stimulation (Millan, 1999). Well-known for evaluating the effects of analgesic treatments on long-lasting pain, the formalin test also allows the recording of behavioral reactions relayed at different levels of the central nervous system (Porro et Cavazzuti, 1993). Aside from the spinal cord, formalin-evoked responses seem to be mainly integrated in the brainstem and midbrain, as decerebration and decortication do not affect a range of behaviors (Matthies et Franklin, 1992, 1995). Regarding the stereotypical nocifensive behaviors observed following formalin administration, it was shown that the persistence of limb flexion is largely a spinal reflex, as it can be evoked following chronic spinalization (Coderre *et al.*, 1994). Conversely,

supraspinal influences have been proposed to contribute in licking/biting behavioral manifestations associated with pain (Ceccarelli *et al.*, 2003; Sawynok et Reid, 2001; You *et al.*, 2006). With this perspective, we could therefore hypothesize that NTS2 agonists, reducing spontaneous pain manifested by paw lifting, may specifically recruit spinal endogenous antinociceptive systems. Alternatively, the cumulative effects of NT69L (which binds to both NTS1 and NTS2) on lifting and licking/biting behaviors may reveal that NTS1 receptor activation modulates supraspinal nociceptive networks following formalin-induced tissue injury.

Persistent nociceptive stimulation of primary sensory afferents causes prolonged alterations in the neurochemistry and phenotype of postsynaptic dorsal horn neurons. It enhances their excitability leading to hyperalgesia and allodynia that develop after tissue injury. Accordingly, noxious stimuli initiate specific spatio-temporal patterns of *c-fos* expression within the spinal cord, allowing mapping of spinal nociresponsive neuronal populations (including projection cells and both excitatory and inhibitory interneurons) (Hunt *et al.*, 1987; Menetrey *et al.*, 1989). In the present study, we used *c-fos* expression as an anatomical correlate of the behavioral measures to evaluate the antinociceptive activity of NTS2 compounds. Our results revealed that intrathecal NTS2 agonists reverse formalin-induced activation of *c-fos*-like immunoreactivity within the dorsal horn (Figs. 5, 6). Specifically, we found that JMV-431 and levocabastine significantly reduced *c-fos*-LI within the superficial layers of the rat spinal cord (Rexed's laminae I-II), and also exerted inhibitory effects on noxiously evoked *c-fos* expression in deeper laminae. In view of its spinal distribution (Sarret *et al.*, 2005), NTS2 receptor-mediated inhibition of nociceptive transmission may occur at multiple laminae levels.

Converging evidence supports the idea that noxious inputs to the spinal cord are actively modulated by descending systems that serve not only to inhibit, but also to facilitate nociception (Vanegas et Schaible, 2004). The participation of these supraspinal sites is of great clinical significance as it is now apparent that the development and maintenance of exaggerated pain states may result from an alteration of the balance between facilitatory and inhibitory brain circuits (Gebhart, 2004). During the formalin response, the descending pain-control influences originating from the rostroventromedial medulla are indeed essential in maintaining the nociceptive behavioral manifestations (Vanegas et Schaible,

2004). The mechanisms by which NT receptor agonists induce analgesia may therefore arise from local spinal pain inhibition or regulation of supraspinal inputs. As spinal activation of NTS2 receptors was shown here to block specifically the nociceptive behaviors integrated at the spinal cord level, we might propose that spinal delivery of NTS2 agonists interrupts conduction of the nociceptive processing by reducing excitability of peripheral primary afferent terminals and inhibits dorsal horn *c-fos* nociceptive interneuron activity. However, since non-discriminative agonists reversed supraspinal nociceptive behaviors, the antinociception observed could also rely on the inhibition of the spino-bulbo-spinal loop by NTS1 receptor activation. It is currently thought that this inhibitory drive is due to a reduction in the activity levels of *c-fos*-positive neurons projecting to upper brainstem structures (Roussy *et al.*, 2008).

To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that activation of NTS2 receptors induces analgesia in a persistent pain model. The intrathecal administration of NTS2 drugs was shown to reduce behavioral and molecular markers of persistent inflammatory pain. Our results also suggest that a dichotomy exists between the spinal antinociceptive actions of NTS2-selective agonists and NTS1/NTS2 mixed compounds. Further research to design NTS1 and NTS2-selective novel analogs that cross the blood-brain barrier may therefore offer new avenues for the treatment of chronic pain.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GR carried out the behavioural and immunohistological experiments, data analysis and drafted the manuscript. MAD participated in the behavioral experiments. SB participated in immunohistological experiments. FE carried out binding experiments. JM and ER developed neurotensinergic analogs. KB carried out technical assistance. NB participated in the coordination of the study and drafted the manuscript. PS conceived the study and participated in its design, coordination and wrote the final version of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements:

This work is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-74618), the Cancer Research Society (CRS) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, 327122-06) awarded to P.S. G.R. and M.A.D. are both supported by the Sir Frederick Banting and Dr. Charles Best Canada Graduate Scholarships. P.S. is a CIHR new investigator. Dr. Sarret is director of the Sherbrooke's Neuroscience Center and member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne Lebel.

DISCUSSION (THÈSE)

Le traitement actuel de la douleur inclut les opioïdes, dont la morphine qui est considérée comme l'étalon d'or pour soulager les phénomènes douloureux chroniques, incluant la douleur cancéreuse osseuse (Kirou-Mauro *et al.*, 2009). Pour soulager efficacement la majorité des manifestations douloureuses de ce type de douleur, des doses élevées de morphine sont nécessaires (Luger *et al.*, 2002). Ce dosage implique que l'efficacité de la morphine est limitée par l'apparition de différents effets secondaires dont la sédation et la constipation. Il est donc primordial de rechercher de nouvelles alternatives aux traitements actuels dans le but d'améliorer le soulagement de la douleur cancéreuse osseuse et ce en limitant les effets secondaires.

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont été réalisées dans le but de découvrir des traitements efficaces contre la douleur chronique. Par contre, très peu de molécules ont fait leur apparition sur le marché au cours de cette période (Kissin, 2010). Cette situation peut découler du développement de modèles animaux peu représentatifs de la physiopathologie et/ou de l'utilisation de tests comportementaux ne permettant pas d'évaluer la douleur telle que décrite par les patients.

Dans le but d'améliorer cette situation, un nouveau modèle de douleur cancéreuse osseuse chez la souris a été développé et caractérisé à l'aide d'appareils novateurs tels que le test de distribution pondérale dynamique et l'actimètre. Dans ce modèle, la douleur cancéreuse osseuse s'est manifestée dès le 11^e jour suivant l'injection de cellules cancéreuses au niveau fémoral. Cette douleur est corrélée avec la destruction osseuse observée dès le jour 11 post-chirurgie et l'augmentation de l'activité neuronale au jour 18. De plus, ce modèle a permis l'évaluation d'agonistes neurotensinergiques révélant le récepteur NTS2 comme étant la cible la plus prometteuse pour soulager la douleur cancéreuse osseuse.

1. Développement d'un modèle de douleur cancéreuse osseuse

La douleur cancéreuse osseuse origine principalement de la présence de métastases osseuses dérivées d'un cancer primaire métastatique tels que les cancers de la prostate et du sein (Rosol *et al.*, 2003). Dans le cas du cancer du sein métastatique, les os longs sont particulièrement visés comme sites distants pour l'établissement de métastases secondaires (Rubens, 1998). Pour mimer cette situation, la majorité des modèles pré-cliniques actuels consistent à injecter des cellules cancéreuses directement dans le fémur (Geis *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2011; Honore *et al.*, 2000b; Schwei *et al.*, 1999; Zwolak *et al.*, 2008b). Bien que l'injection directe dans le fémur ne reflète pas exactement la réalité physiopathologique, elle permet de standardiser le modèle et de suivre l'évolution cancéreuse et douloureuse chez l'animal (Goblirsch *et al.*, 2005). Pour remédier à la situation, certaines équipes ont opté pour l'injection au niveau cardiaque, mais ce type d'injection engendre une variabilité interindividuelle, crée une dissémination au-delà de l'os (poumons, foie et cerveau) et rend le suivi des animaux plus difficile (Canon *et al.*, 2008; Chanda *et al.*, 2008; Hamaguchi *et al.*, 2011; Strube *et al.*, 2009).

Le modèle développé au laboratoire consiste donc à injecter des cellules cancéreuses au niveau du fémur de souris C57BL/6. Les cellules choisies, les E0771, diffèrent de celles couramment injectées chez la souris au niveau fémoral soit les NCTC 2472, syngéniques pour les souris C3H (Honore *et al.*, 2000b; Schwei *et al.*, 1999). Les NCTC 2472 sont dérivées d'un fibrosarcome, un cancer primaire, représentant moins de 1% de tous les cancers diagnostiqués, ce qui ne représente aucunement la majorité des situations de douleur induite au niveau osseux (Hameed et Dorfman, 2011; Weber *et al.*, 2008). En fait, le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme et la présence de métastases osseuses est détectée dans 70-85% des cas (Coleman et Rubens, 1987; Jemal *et al.*, 2009). C'est pourquoi quelques laboratoires ont développé des modèles chez la souris immunodéficientes consistant à l'injection des cellules cancéreuses mammaires humaines (Bloom *et al.*, 2011; Canon *et al.*, 2008; Chanda *et al.*, 2008; Hamaguchi *et al.*, 2011; Strube *et al.*, 2009; van Beek *et al.*, 2009). L'utilisation de souris immunodéficientes permet d'éviter ou d'atténuer une réaction immunologique et/ou inflammatoire qui pourrait

être dirigée contre les cellules provenant d'une autre souche. Par contre, ce modèle ne reflète pas la réalité physiopathologique puisqu'il est reconnu que le système inflammatoire est impliqué dans le développement et l'intensité de la douleur cancéreuse osseuse (Berezhnaya, 2010). Dans notre modèle, nous avons donc opté pour l'injection de cellules du cancer du sein métastatique, les E0771, syngéniques pour les souris C57BL/6.

Peu étudiées, les E0771, dérivées d'un cancer du sein spontané de souche C57BL/6, sont reconnues comme étant hautement invasives (Ewens *et al.*, 2006). Tout d'abord, pour les caractériser, nous avons injecté les E0771 au niveau sous-cutané où nous avons constaté que leur croissance était essentiellement linéaire (Figure 7C). Ce taux de croissance constant a aussi été décrit suite à l'implantation des E0771 au niveau d'un site périphérique où un examen de la tumeur a révélé que cette croissance linéaire pourrait résulter de la formation de kystes, de nécrose et d'ulcération périphérique (Ting, 1952). De plus, dans cette même étude, il a été rapporté que le taux de croissance se modifie graduellement à l'atteinte d'une certaine grosseur tumorale, phénomène que nous avons observé à partir du cinquième jour post-détection (Figure 7C) (Ting, 1952).

Par la suite, une coloration hématoxyline-éosine a été réalisée sur les tumeurs produites par l'injection sous-cutanée des E0771 (Figure 7D). Des signes de malignité ont été observés soit la présence de nombreuses cellules polymorphes, en mitose ou en apoptose (Rosen, 2008). De plus, le caractère hautement invasif s'est révélé par l'invasion par des cellules cancéreuses du tissu adipeux et musculaire entourant les tumeurs (Figure 7D). L'aspect invasif se crée via des facteurs, tels que les MMPs relâchées pour dégrader la matrice extracellulaire. Les principales MMP impliquées dans le cancer du sein métastatique sont les MMP2 et MMP9 (La Rocca *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2011). Nous avons détecté l'ARNm de ces MMPs et la protéine MMP9 chez les E0771 et dans des tumeurs sous-cutanées et osseuses obtenues suite à l'injection des E0771, confirmant ainsi le caractère invasif de ces cellules (Figure 7A et B). Par contre, la protéine MMP9 détectée chez les E0771 en culture possède une taille un peu plus élevée que celle exprimée par les tumeurs sous-cutanées et osseuses (Figure 7B). Cela peut résulter de 1) la formation d'un complexe entre MMP9 et une microglobuline de 25 kDa tel que déjà rapporté dans la littérature ou 2) de clivages protéolytiques (Kjeldsen *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 2000; Triebel *et al.*, 1992). Il

a aussi été démontré par Western Blot que la pro-MMP9 pouvait subir différents clivages protéolytiques lors d'un cancer du sein (Olson *et al.*, 2000).

Sachant que les cellules du cancer du sein peuvent être hormono-dépendantes, le profil oestrogénique des E0771 a aussi été déterminé par PCR. Nous avons déterminé que les transcrits d'ER α et d'ER β sont exprimés par les E0771 ce qui corrèle avec une étude ayant démontré l'expression protéique d'ER α chez ces mêmes cellules (Figure 7A) (Gu *et al.*, 2009). Puisque l'oestrogène peut influencer la perception douloureuse et la croissance tumorale, nous avons donc choisi de faire la caractérisation de notre modèle chez des souris mâles (Aloisi et Bonifazi, 2006; Cairns et Gazerani, 2009; Dickenson et Sullivan, 1987; Lippman et Dickson, 1989).

Au niveau des chirurgies réalisées chez la souris pour induire la douleur cancéreuse osseuse, même si le canal médullaire de souris adultes peut contenir un volume maximal de 9.5 μ L, tous les modèles actuels incluent une injection fémorale d'un volume variant entre 10 et 20 μ L de milieu de culture, de PBS ou d'HBSS (Hansen *et al.*, 2011; Honore *et al.*, 2000b; King *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2004; Schwei *et al.*, 1999; Zilber *et al.*, 2008). Seuls Lozano-Ondoua et ses collaborateurs ont procédé à une injection de 5 μ L de milieu de culture contenant les cellules NCTC 2472, précédée d'une arthrotomie (atteinte/ouverture de l'articulation) (Lozano-Ondoua *et al.*, 2010). Pourtant, il a été démontré qu'au-delà de 9.5 μ L, une dilatation des vaisseaux ainsi que la production d'artéfacts osseux sont observés autour du fémur (Zilber *et al.*, 2008). Pour éviter une interprétation faussée de l'impact osseux des E0771 dans notre modèle, nous avons injecté un volume de 5 μ L de HBSS contenant les cellules. Le HBSS a été choisi pour assurer la survie cellulaire dans le but que seul le microenvironnement osseux, et non les facteurs de croissance contenus dans le milieu de culture, influence la croissance des E0771. De plus, pour minimiser l'impact de la chirurgie sur les résultats comportementaux, l'injection des cellules a été réalisée sans arthrotomie, déplacement des ligaments patellaires ou d'altération de l'articulation tels que pratiqués dans certaines études (Hansen *et al.*, 2011; Honore *et al.*, 2000a; King *et al.*, 2007; Luger *et al.*, 2002; Sabino *et al.*, 2003; Schwei *et al.*, 1999). Le modèle développé et présenté dans cette thèse permet donc d'évaluer l'impact réel des E0771 sur la dégradation osseuse et la douleur en résultant.

2. Caractérisation du modèle de douleur cancéreuse osseuse

Les métastases osseuses d'origine mammaire induisent davantage de destruction que de formation osseuse (Harvey et Cream, 2007; Roato *et al.*, 2005). Dans notre modèle, les E0771 ont provoqué de l'ostéolyse principalement au niveau trabéculaire dès le jour 11 post-chirurgie. En effet, par tomодensitométrie, l'évaluation osseuse a révélé un facteur de motif trabéculaire élevé et une faible épaisseur trabéculaire (Figure 9). Au 18^e jour suivant la chirurgie, cette atteinte osseuse s'est traduite par une fracture chez plusieurs animaux. Ces résultats indiquent donc une perte importante de l'intégrité trabéculaire dans notre modèle ce qui corrèle avec les observations faites dans d'autres modèles animaux et dans la pathologie humaine (Armamento-Villareal *et al.*, 2009; Dore-Savard *et al.*, 2010; Rauch, 2009). En fait, chez l'humain, un facteur de motif trabéculaire élevé est associé avec un risque plus élevé de fracture (Hahn *et al.*, 1992). Les images de Faxitron et les études d'IRM réalisées sur notre modèle confirment que la croissance tumorale affecte sévèrement la structure osseuse suite à l'injection des E0771 (Figure 8). De plus, l'IRM indique une accumulation de l'agent de contraste plus importante autour de la partie proximale du fémur pouvant révéler de l'œdème et/ou de l'inflammation causé par la progression tumorale (Figure 8B). Une augmentation similaire de l'agent de contraste a aussi été observée dans un autre modèle de douleur cancéreuse osseuse où il a aussi été impossible de distinguer l'œdème de l'inflammation (Dore-Savard *et al.*, 2010). L'accumulation de l'agent de contraste au niveau de l'épiphyse proximale et de la métaphyse semble indiquer que le site d'injection est situé à cet endroit. Par contre, dans notre modèle, les E0771 ont bel et bien été injectées au niveau de la diaphyse distale. Cette situation peut découler du fait que les métastases osseuses du cancer du sein se logent principalement au niveau de la métaphyse qui est un milieu propice à l'adhésion et à la croissance cellulaire (Bussard *et al.*, 2008; Mastro *et al.*, 2003; Mazo *et al.*, 1998; Mazo et von Andrian, 1999; Welch *et al.*, 2003). De plus, il faut tenir compte du mouvement de la moelle osseuse vers l'ouverture osseuse formée lors de la chirurgie, de la posture et de la gravité chez les quadrupèdes favorisant l'accumulation des cellules cancéreuses au niveau de la partie proximale du fémur.

La perte de l'intégrité osseuse, jumelée à la croissance tumorale, provoque la stimulation, via différents mécanismes, des fibres afférentes primaires A δ et C situées dans le périoste, l'os minéralisé et la moelle osseuse pour produire de la douleur continue, spontanée et induite par le mouvement (Clines et Guise, 2008; Luger *et al.*, 2005; Mach *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2007). Cette atteinte des fibres afférentes primaires induit une douleur s'amplifiant dépendamment de la progression du cancer. La douleur ressentie se manifeste spontanément et sous forme d'épisodes de douleur intense (Honore *et al.*, 2000a; Sabino *et al.*, 2003). Elle est mesurée dans différents modèles animaux sous différentes formes telles que l'allodynie, l'inconfort ambulateur et la douleur induite par le mouvement forcé (Dore-Savard *et al.*, 2010; Dudek *et al.*, 2008; Geis *et al.*, 2010; Hald *et al.*, 2009a; Honore *et al.*, 2000a; Medhurst *et al.*, 2002; Niiyama *et al.*, 2009; Niiyama *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2005). Nous avons donc tout d'abord évalué l'allodynie mécanique qui est une douleur induite par le toucher. Similairement aux modèles actuels où elle apparaît entre les jours 7 et 14, l'allodynie mécanique s'est développée dans notre modèle à partir du jour 11 suivant la chirurgie pour augmenter graduellement jusqu'au jour 18 (Figure 10A). Puisque nous avons utilisé un von Frey automatique, les valeurs que nous avons obtenues sont légèrement plus élevées comparativement à ce qui est rapporté dans la littérature avec des filaments de von Frey manuels (Hald *et al.*, 2008; Hald *et al.*, 2009b; King *et al.*, 2007; Lozano-Ondoua *et al.*, 2010; Svensson *et al.*, 2008)). Le von Frey automatique peut donc être considéré moins sensible que le von Frey manuel chez la souris. Une autre différence se situe au niveau du pourcentage de poids pouvant être appliqué par le filament de von Frey sur la patte ipsilatérale comparativement à la patte controlatérale. La diminution du seuil de retrait au dernier jour de test est de 51% dans notre modèle et de 60 à 100% dans les modèles actuels (Hald *et al.*, 2009a; Hald *et al.*, 2009b; Honore et Mantyh, 2000; King *et al.*, 2007; Svensson *et al.*, 2008). Cette différence peut autant résulter du type cellulaire utilisé que du fait que notre modèle est évalué jusqu'au 18^e jour post-chirurgie tandis que les modèles actuels durent jusqu'au 21^e jour (Hald *et al.*, 2009a; Hald *et al.*, 2009b; Honore et Mantyh, 2000; King *et al.*, 2007; Svensson *et al.*, 2008).

La progression cancéreuse osseuse provoque l'apparition d'épisodes douloureux intenses pouvant survenir lors d'activités ambulatrices normales ou forcées. L'inconfort lors d'une

ambulation non-forcée a donc été testé par le test de distribution pondérale dynamique et par l'actimètre dans notre modèle (Figure 10B et C). Ces deux tests ont l'avantage de permettre l'étude des animaux dans un environnement où ils sont libres de tous mouvements. Ainsi, les animaux ne subissent aucune contention ou aucun stress qui pourrait venir jouer sur la perception de la douleur tel est le cas du test de distribution pondérale statique qui nécessite une contention de l'animal. De plus, les résultats obtenus avec ce test statique concernent uniquement les deux pattes arrières du rongeur même s'il est un quadrupède et qu'une compensation peut survenir au niveau des pattes avant lors d'un cancer (Dore-Savard *et al.*, 2010; Tetreault *et al.*, 2011). Au test de distribution pondérale dynamique, les animaux cancéreux ont progressivement diminué le poids apposé sur leur patte arrière ipsilatérale entre les jours 11 et 18 suivant la chirurgie. Au jour 18, le poids du côté ipsilatéral a atteint une diminution de 75% comparativement aux animaux contrôles (Figure 10B). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de douleur cancéreuse osseuse réalisé chez le rat suite à l'injection fémorale de cellules cancéreuses mammaires où une diminution importante du poids ipsilatéral a été observée chez les animaux porteurs d'une tumeur osseuse (Tetreault *et al.*, 2011). Chez la souris, peu d'études ont analysé l'inconfort ambulateur ou le poids apposé sur la patte ipsilatérale lors d'un cancer osseux. Le test de distribution pondérale statique a été utilisé suite à l'injection des cellules NCTC 2472 au niveau fémoral démontrant une diminution du poids apposé du côté ipsilatéral variant entre 20% et 58% selon un ratio poids ipsilatéral/poids total des deux pattes arrières (Hald *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2011). Tel qu'expliqué précédemment, le test statique nécessite une contention pouvant créer un stress et ainsi modifier la perception douloureuse. Il est donc difficile de comparer ces résultats avec ceux que nous avons obtenus lors du test de distribution pondérale dynamique. Par contre, Niiyama et ses collaborateurs ont étudié le modèle de souris avec cellules NCTC 2472 dans une version personnalisée du test de distribution pondérale dynamique. Suite à la mise en place des souris ayant un cancer osseux dans une cage en plexiglas, les expérimentateurs ont noté visuellement l'aspect de la patte ipsilatérale lorsque les souris optaient pour la position debout sur leurs pattes arrières. Les valeurs accordées variaient entre zéro et trois où zéro correspondait à aucun poids sur la patte ipsilatérale et trois, poids normal sur la patte ipsilatérale (Niiyama *et al.*, 2007). Malheureusement, il nous est impossible de

comparer nos résultats à cette étude, car aucune comparaison entre les groupes sham et cancer n'a été effectuée en raison de l'absence de présentation des données obtenues pour les animaux contrôles.

L'inconfort ambulatorio peut mener à une réduction nette de l'ambulation en période active chez les rongeurs, soit la nuit, pouvant être mesurée à l'aide de l'actimètre. Les résultats de l'actimètre ont révélé que les animaux cancéreux font moins de mouvements de base (position du corps complètement changée dans l'appareil) que les animaux sham en période active aux jours 14 et 18 post-chirurgie (Figure 10C). Une étude récente a réalisé une expérience similaire à l'aide d'un appareillage comparable chez des souris ayant reçu une injection fémorale de cellules NCTC 2472. Par contre, les enregistrements de l'activité ont été faits sur une très courte période (30 ou 140 minutes) et n'ont pas été comparés aux souris sham. Il nous est alors difficile de comparer nos résultats aux leurs (Hald *et al.*, 2008). La diminution d'activité que nous avons observée chez les souris cancéreuses reflète bien la réalité de la pathologie humaine de la douleur cancéreuse osseuse. En effet, une étude récente, réalisée chez des patients cancéreux présentant des épisodes douloureux intenses, a noté que chez 78% de ces patients, la douleur est amplifiée lors d'activités (Portenoy *et al.*, 2010). De plus, une autre étude a rapporté que 44% des patients cancéreux expérimentant des épisodes douloureux intenses ressentent de la douleur induite par le mouvement causée par la présence de métastases osseuses (Mercadante *et al.*, 2011). Ces épisodes intenses de douleur induisent donc couramment une diminution de l'ambulation chez les patients atteints d'un cancer (Coleman, 1997; Mercadante et Fulfaro, 2007; Zeppetella, 2009).

Pour caractériser indirectement la douleur induite par le mouvement forcé dans notre modèle, nous avons choisi le Rotarod qui permet de déterminer l'utilisation de la patte. Nous avons pu observer que les souris développant un cancer osseux ont réduit leur utilisation de leur patte ipsilatérale dès le jour 11 suivant la chirurgie. Cette atteinte s'est amplifiée jusqu'au jour 18 pour atteindre une diminution maximale de 75% de l'utilisation de la patte ipsilatérale versus les animaux sham (Figure 10D). Des résultats similaires ont été décrits dans la littérature où une diminution de l'utilisation de la patte ipsilatérale se situait entre 50 et 67% chez les souris cancéreuses au jour 18 post-chirurgie (Dudck *et al.*, 2008; El Mouedden et Meert, 2005, 2007; Sabino *et al.*, 2003; Zwolak *et al.*, 2008b). Ces

résultats démontrent, tel qu'expliqué précédemment, que la douleur induite par le mouvement est sévère et qu'elle est amplifiée lorsque le mouvement est forcé.

La douleur osseuse chronique produit des changements neurochimiques dans le SNC. Dans les modèles animaux procédant à une injection fémorale, ces changements sont observés au niveau lombaire de la moelle épinière puisque les afférences fémorales projettent dans les sections L1 à L3 (Peters *et al.*, 2005). Dans notre modèle, une augmentation de l'activité neuronale, observée à l'aide de l'activation du gène *C-fos*, a été induite suite à l'injection des E0711 dans les lamina I, II III à VII des sections L1 à L3 du côté ipsilatéral. Un patron d'expression similaire a aussi été noté dans les modèles actuels au niveau des lamina profondes soit les lamina V à VIII (Dore-Savard *et al.*, 2010; Schwei *et al.*, 1999). En douleur cancéreuse chronique, les fibres A δ et C sont hautement sollicitées par différents stimuli tels que la compression mécanique, l'acidification du milieu environnant et la libération de facteurs par les cellules cancéreuses. Il y a alors augmentation de l'activité neuronale spinale dans certaines lamina puisque les fibres A δ et C projettent principalement au niveau des lamina superficielles. Avec la chronicité de la douleur, les fibres A β peuvent aussi être sollicitées considérant l'aspect neuropathique de la douleur cancéreuse osseuse. En effet, ce phénomène a particulièrement été décrit en douleur neuropathique chronique où les fibres A β , qui projettent dans les lamina plus profondes (V et VI), sont excitées (Dworkin, 2002). Dans notre modèle, une hausse de l'activité neuronale a aussi été notée dans la lamina X, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapporté dans un autre modèle de douleur cancéreuse osseuse. Cette activité peut être attribuée à l'atteinte de la moelle osseuse suite à l'injection des E0771, car il a été démontré qu'une infection virale de la moelle osseuse résulte en un marquage neuronal au niveau de la lamina X (Denes *et al.*, 2005). De plus, l'activation neuronale dans la lamina X, relais de l'information viscérale, peut être associée à la douleur viscérale référée que rapportent certains patients atteints d'un cancer osseux. Pour ce qui est du côté controlatéral, une augmentation de l'activité neuronale dans les lamina III à VII a aussi été induite dans notre modèle. Seule une autre étude a rapporté un résultat similaire avec une hausse de l'activation du gène *C-fos* dans les lamina VII à VIII (Dore-Savard *et al.*, 2010). La présence d'activité neuronale du côté controlatéral peut résulter du débalancement pondéral survenant chez les souris

ayant un cancer osseux. En effet, l'augmentation chronique du poids apposé sur la patte controlatérale favorise l'activation mécanique des fibres A δ et A β et ainsi l'expression du gène *C-fos* dans certaines lamina.

Puisque la morphine est le traitement de choix contre la douleur cancéreuse osseuse et que son efficacité a été démontrée dans certains modèles actuels, nous l'avons testé dans notre modèle (El Mouedden et Meert, 2005, 2007; Honore *et al.*, 2000b; Luger *et al.*, 2002; Menendez *et al.*, 2003). Pour pouvoir observer des effets analgésiques significatifs sur la douleur cancéreuse osseuse, les doses de morphine injectées ponctuellement doivent être élevées chez la souris (El Mouedden et Meert, 2005; Luger *et al.*, 2002). L'injection sous-cutanée de 30 mg/kg de morphine à chaque jour de test a donc réduit significativement l'allodynie mécanique et la douleur induite par le mouvement forcé dans notre modèle. Par contre, les hautes doses de morphine administrées par voie systémique chez la souris sont accompagnées d'effets secondaires tels que l'hypothermie, l'ataxie et la stimulation motrice (Belknap *et al.*, 1998; Cook et Beardsley, 2003; Koek *et al.*, 2012; Zarrindast et Zarghi, 1992). D'ailleurs, cette activité locomotrice est augmentée graduellement suite à l'injection aux trois à quatre jours de morphine sur une période de 15 à 20 jours (Kuribara, 1995). De plus, lorsque la douleur cancéreuse osseuse progresse et que la pathologie atteint un stade avancé, un traitement chronique de morphine peut être prescrit. L'injection continue de morphine chez les modèles animaux engendre malheureusement des effets indésirables tels qu'une augmentation de la douleur et de la destruction osseuse (Cao *et al.*, 2010; King *et al.*, 2007). C'est pourquoi le développement et la découverte d'un traitement alternatif empruntant des voies non-opioïdiques serait le bienvenu.

3. Évaluation des agonistes neurotensinergiques en douleur tonique

Les effets analgésiques de la NT et des agonistes de ses récepteurs ont été démontrés à plusieurs reprises, essentiellement en douleur aiguë (Tableau 3) (Buhler *et al.*, 2005; Dore-Savard *et al.*, 2008; Dubuc *et al.*, 1999b; Maeno *et al.*, 2004; Sarret *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1997; Tyler *et al.*, 1998a). Cette analgésie a la particularité d'être indépendante des voies opioïdiques, car elle n'est pas renversée par un antagoniste non-sélectif des

récepteurs opioïdiques (Clineschmidt *et al.*, 1979). Les récepteurs de la neurotensine pourraient donc s'avérer être des cibles alternatives potentielles aux agonistes opioïdiques.

Pour le criblage des drogues et leur avancement dans le processus pré-clinique, un test de douleur plus approprié qu'un test de douleur aiguë doit être effectué. Le test à la formaline est le test de douleur de choix pour cribler les drogues et évaluer leur potentiel analgésique en douleur chronique. En effet, il a été démontré que les résultats obtenus dans la deuxième phase, ou phase inflammatoire, du test à la formaline corrélaient avec les résultats observés dans un modèle de douleur neuropathique chronique (Vissers *et al.*, 2003; Vissers *et al.*, 2006). Puisque la douleur cancéreuse osseuse possède un aspect neuropathique tout en étant unique, nous croyons que le test à la formaline est un outil essentiel pour déterminer l'efficacité analgésique potentiel que pourrait induire des agonistes neurotensinergiques une fois testés dans notre modèle. Une première étude a été réalisée pour analyser le potentiel de la NT et de deux agonistes neurotensinergiques au test à la formaline chez le rat (Roussy *et al.*, 2008). L'efficacité analgésique de l'injection intrathécale de la NT, du PD149163 (agoniste sélectif NTS1) et du NT69L (agoniste non-sélectif) dans la deuxième phase du test à la formaline a été montrée (résultats similaires chez la souris). Dans cette même étude, les agonistes ont aussi été co-injectés avec un antagoniste du récepteur NTS1, le SR48692. Celui-ci a renversé partiellement l'effet analgésique des agonistes indiquant l'implication d'un second récepteur dans l'analgésie induite via les voies neurotensinergiques. Tout comme le récepteur NTS1, le récepteur NTS2 est impliqué dans la transmission nociceptive puisqu'il est exprimé par les fibres afférentes primaires qui projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière (Roussy *et al.*, 2008; Sarret *et al.*, 2005). Nous avons donc continué l'analyse d'agonistes sélectifs NTS2, le JMV-431 et la lévocabastine, à l'aide du test à la formaline (Roussy *et al.*, 2009). L'injection intrathécale de JMV-431 ou de lévocabastine a diminué la douleur tonique chez le rat, principalement dans la phase inflammatoire. Ces résultats, similaires chez la souris, indiquent que le récepteur NTS2 est impliqué dans les effets analgésiques neurotensinergiques tel que démontré dans différents tests de douleur aiguë (Dore-Savard *et al.*, 2008; Maeno *et al.*, 2004; Sarret *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011). Le test à la formaline permet aussi l'étude des différentes régions qui relaient l'information nociceptive dans le SNC. En effet, suite à

l'injection de formaline des comportements d'origine spinale (stade 2 : réflexe spinal) ou supraspinale (stade 3 : léchage, mordillement, secouement) sont observés. Lorsque ces comportements sont décortiqués, les résultats indiquent que l'agoniste non-sélectif (NT69L) influence les comportements spinaux et supraspinaux tandis que les agonistes sélectifs NTS2 (JMV-431, lévocabastine) sont effectifs sur les comportements spinaux seulement. Ces résultats corrélerent avec une étude ayant démontré l'efficacité analgésique des agonistes sélectifs NTS2 dans le test du retrait de la queue mesurant un réflexe spinal (Sarret *et al.*, 2005). De plus, les effets spinaux des agonistes NTS2 ont été évalués via l'activité neuronale spinale. Le JMV-431 et la lévocabastine ont diminué l'activation du gène *C-fos* dans les lamina I à VI démontrant que les agonistes NTS2 peuvent inhiber la transmission douloureuse à différents niveaux dans la moelle épinière tout comme les agonistes NTS1 (Roussy *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus en douleur tonique indiquent le potentiel analgésique des agonistes neurotensinergiques dans des modèles de douleur chronique tel que la douleur cancéreuse osseuse. De plus, ce possible potentiel analgésique est supporté par les résultats obtenus dans notre laboratoire par Annie Guillemette démontrant l'efficacité analgésique des agonistes neurotensinergiques en douleur chronique neuropathique, une composante de la douleur cancéreuse (Tableau 3) (Guillemette *et al.*, 2011).

Approches/Récepteurs	NTS1	NTS2
Pharmacologique	Buhler et al. (2005) Pain Smith et al. (1997) J Pharm Exp Ther Urban et Gebhart (1997) J Neurophysiol	Sarret <i>et al.</i> (2005) J Neurosci
Génique	Pettibone et al. (2002) J Pharm Exp Ther Tyler <i>et al.</i> (1998) Brain Res	Doré-Savard <i>et al.</i> (2008) Mol Ther Maeno <i>et al.</i> (2004) Brain Res Smith et al. (2011) Behav Brain Res
Pharmacologique	Roussy <i>et al.</i> (2008) J Neurochem	Roussy <i>et al.</i> (2009) Mol Pain Dubuc <i>et al.</i> (1999) Eur J Pharmacol Boules <i>et al.</i> (2010) Brain Res Boules <i>et al.</i> (2011) Behav Pharmacol
Génique		Dubuc <i>et al.</i> (1999) J Neurosci Remaury <i>et al.</i> (2002) Brain Res
Pharmacologique	Guillemette <i>et al.</i> (2011) Eur J Pain	
Génique		

Tableau 3. Implication des récepteurs NTS1 et NTS2 en douleur aiguë, persistante et chronique.

Études ayant démontré les effets analgésiques des récepteurs NTS1 et NTS2 en douleur aiguë, persistante et chronique via des approches pharmacologiques et géniques chez le rat et la souris.

4. Évaluation des voies neurotensinergiques en douleur cancéreuse osseuse

Suite aux résultats obtenus en douleur tonique, deux agonistes sélectifs, soit le PD149163 et le JMV-431, ont été retenus pour être évalués en douleur cancéreuse osseuse dans notre modèle. La lévocabastine a été écartée en raison de son manque de spécificité vis-à-vis du système neurotensinergique puisqu'elle peut lier le récepteur histaminique H1. De plus, le récepteur H1 influence la perception douloureuse, car lorsque son gène est invalidé chez des souris, la douleur mesurée est diminuée dans deux types de tests comportementaux (douleur aiguë et tonique) (Mobarakeh *et al.*, 2000). Puisque la nature de la lévocabastine est ambiguë (agoniste, agoniste inverse ou antagoniste), nous avons préféré la retirer de

l'étude (Boules *et al.*, 2009; Bredeloux *et al.*, 2006; Dubuc *et al.*, 1999a; Sarret *et al.*, 2005).

Un agoniste sélectif et des souris KO ont été utilisés pour étudier le récepteur NTS1 dans notre modèle. Le PD149163, un agoniste sélectif NTS1, s'est avéré être efficace pour diminuer significativement l'allodynie mécanique dans notre modèle. Par contre, aucune différence n'a été observée au niveau de l'utilisation de la patte au Rotarod et du poids appliqué sur la patte ipsilatérale au test de distribution pondérale dynamique comparativement aux souris atteintes d'un cancer osseux traitées à la saline. Le PD149163 s'est donc révélé inefficace contre la douleur induite par le mouvement forcé et l'inconfort ambulateur des souris cancéreuses. Actuellement, tous les effets secondaires attribués à la neurotensine, tels que l'hypothermie et l'hypolocomotion, ont été associés au récepteur NTS1 (Bissette *et al.*, 1976; Boules *et al.*, 2003; Remaury *et al.*, 2002). En se basant sur les résultats obtenus au test à la formaline, nous avons opté pour la plus faible dose efficace pour le PD149163 pour éviter la présence d'effets secondaires dans notre étude. Malgré cette précaution, il semble que la diminution de l'activité spontanée induite via NTS1 a camouflé ou prévenu l'effet analgésique du PD149163 au Rotarod et au test de distribution pondérale dynamique. Pour ce qui est de l'activité neuronale, même si le PD149163 a diminué la douleur tonique et l'allodynie mécanique en plus de l'activité neuronale en douleur tonique, il n'a aucunement réduit l'expression du gène *C-fos* chez les souris porteuses d'une tumeur osseuse (Roussy *et al.*, 2008). Puisque le PD149163 n'a pas renversé la douleur sévère chez notre modèle dans la majorité des tests comportementaux, son impact sur l'activité neuronale semble donc inexistant.

Pour mieux caractériser le rôle de NTS1 dans notre modèle, nous avons effectué des chirurgies pour induire la douleur cancéreuse osseuse chez des souris invalidées pour le récepteur NTS1. Tout d'abord, nous avons regardé l'impact osseux du récepteur NTS1 dans notre modèle. Les ostéoblastes et les ostéoclastes peuvent exprimer différents récepteurs, mais NTS1 ne semble pas être présent chez ces types cellulaires, car tous les paramètres osseux étaient identiques entre les génotypes WT et KO NTS1. Chez les souris KO NTS1, l'allodynie mécanique s'est moins développée que chez les souris WT. Pourtant, nous avons précédemment démontré que l'injection de l'agoniste sélectif NTS1, PD149163, menait aussi à la diminution de l'allodynie mécanique dans notre modèle. Nous

pouvons alors supposer qu'en condition chronique, il y a une augmentation significative de la libération endogène de NT. Chez ces souris, il y a alors liaison des récepteurs NTS2 par la NT endogène ce qui entraîne de l'analgésie et une réduction de l'allodynie mécanique. La NT pourrait alors jouer un rôle pro-nociceptif chez les souris WT via sa liaison aux récepteurs NTS1. Pour vérifier cette hypothèse, il suffirait d'injecter un antagoniste NTS2 (SR142948A) ou un agoniste sélectif NTS2 (JMV-431) aux souris KO NTS1. Si la NT endogène et le récepteur NTS2 sont impliqués dans l'effet observé au von Frey chez les souris KO NTS1, il y aura une perte d'effet suite à l'injection du SR142948A et une amplification de l'effet avec le JMV-431. Au Rotarod, un effet analgésique a aussi été noté chez les souris KO NTS1 comparativement aux souris WT. Tout comme le résultat obtenu au von Frey, l'hypothèse de la liaison de NT endogène sur les récepteurs NTS2 peut entrer en jeu dans les comportements observés et pourrait être vérifié suite à l'injection d'un antagoniste ou d'un agoniste sélectif pour NTS2. De plus, puisque NTS1 est absent chez les souris invalidées pour ce récepteur, les effets secondaires reliés à ce récepteur et à la NT sont inexistantes. L'amélioration de l'utilisation de la patte chez les souris KO NTS1, et non suite à l'injection de PD149163, peut donc résulter de l'absence d'effet locomoteur négatif engendré via NTS1. Pour ce qui est du test de distribution pondérale dynamique, aucune différence n'a été remarquée entre les génotypes. Par contre, chez les souris KO NTS1, la compensation du poids est davantage sur les pattes avant que sur la patte controlatérale arrière contrairement aux souris WT. Cette tendance indique une redistribution pondérale dynamique différente entre les deux génotypes, phénomène qui ne semble pas être rapporté dans la littérature jusqu'à présent.

Suite à l'analyse de l'effet et du rôle de NTS1 dans notre modèle, nous avons procédé à l'évaluation de NTS2. L'injection i.t. de JMV-431, agoniste sélectif NTS2, a induit des effets analgésiques au von Frey ainsi qu'au Rotarod chez les souris ayant un cancer osseux. L'efficacité du JMV-431 pour diminuer l'allodynie mécanique et la douleur induite par le mouvement forcé corrèle avec ses effets analgésiques observés précédemment au test à la formaline (Roussy *et al.*, 2009). Par contre, le JMV-431 s'est avéré inefficace contre l'inconfort ambulateur analysé à l'aide du test de distribution pondérale dynamique. De plus, un impact spinal du JMV-431 a aussi été observé dans notre modèle par une réduction

de l'activité neuronale dans les lamina V à VII, tel que rapporté en douleur tonique (Roussy *et al.*, 2009).

Pour définir davantage le rôle du récepteur NTS2 dans notre modèle, nous avons fait notre chirurgie chez des souris KO NTS2. Au niveau osseux, le micro-CT n'a révélé aucune différence entre les génotypes. NTS2 ne semble donc pas être exprimé par les ostéoclastes et les ostéoblastes et influence le remodelage osseux dans notre modèle. Du côté comportemental, l'allodynie mécanique qui a été développée chez les souris KO NTS2 est identique à celle des souris WT. Ce résultat est contraire à l'effet anti-allodynique obtenu avec le JMV-431, ce qui confirme que l'activation du récepteur NTS2 est importante pour diminuer l'allodynie mécanique observée dans notre modèle. Par contre, la présence de NTS1 ne semble pas influencer l'allodynie mécanique chez les KO NTS2 malgré la perte de l'interaction fonctionnelle qui est normalement observée entre NTS1 et NTS2. Cette interaction engendre une diminution de l'expression de NTS1 à la membrane cellulaire (Hwang *et al.*, 2010; Perron *et al.*, 2007). En absence de NTS2, NTS1 est donc davantage présent à la membrane puisqu'il y a absence d'interaction fonctionnelle. Puisqu'un ou des systèmes peuvent compenser pour la perte du système invalidé chez les KO, on peut poser l'hypothèse qu'un système compensatoire facilitateur de la douleur plus puissant que NTS1 est activé chez les KO NTS2. Au Rotarod, une meilleure utilisation de la patte ipsilatérale a été notée chez les KO NTS2 aux jours 11 et 14 suivant la chirurgie, mais cette utilisation s'est retrouvée au même niveau que celle des souris WT au jour 18. Étonnamment, l'absence de l'interaction fonctionnelle entre NTS1 et NTS2 ne semble pas influencer les résultats obtenus au Rotarod. L'analgésie et/ou les effets locomoteurs pouvant être induits via le récepteur NTS1, qui est davantage présent à la membrane chez les KO NTS2 en raison de l'absence d'interaction fonctionnelle, semblent être camouflés par un autre système compensatoire.

Ces résultats démontrent que le récepteur NTS2 semble être une meilleure cible que le récepteur NTS1 pour soulager la douleur cancéreuse osseuse. Par contre, davantage d'investigations devront être faites sur la douleur ambulatoire non forcée.

5. Pertinence du test de distribution pondérale dynamique

Il est primordial de développer et de caractériser des modèles animaux reflétant la physiopathologie étudiée. Dans le cas de la douleur cancéreuse osseuse, les modèles ont été analysés à l'aide de différents tests comportementaux, dont certains étaient plus ou moins appropriés. Les tests à prioriser doivent permettre l'évaluation de la douleur telle que décrite par les patients tout en étant adaptés aux animaux utilisés. Un des tests que nous avons sélectionné pour notre étude est le test de distribution pondérale dynamique. Ce test a été conçu pour analyser l'inconfort ambulatorio dans une cage où les animaux sont libres de tous mouvements. L'avantage de ce test réside donc dans le fait qu'il ne nécessite aucune contention pouvant induire un stress et modifier la douleur mesurée (Tetreault *et al.*, 2011). L'appareil a été adapté spécifiquement pour les souris et les résultats obtenus démontrent à quel point l'inconfort est important chez les souris développant un cancer osseux comparativement aux souris sham. Par contre, tel que mentionné précédemment, aucun agoniste n'est parvenu à renverser cet inconfort malgré leur efficacité dans les autres tests comportementaux utilisés dont le Rotarod où la douleur est induite par le mouvement forcé. Nous pouvons donc se demander 1) si le test de distribution pondérale dynamique est assez sensible pour détecter une amélioration de l'inconfort chez la souris peu importe le niveau ou 2) si l'inconfort mesuré avec ce test n'est tout simplement pas affecté par les agonistes testés.

6. Perspectives

Suite aux nombreux résultats obtenus, certaines avenues seraient intéressantes à envisager pour ce projet. Tel que mentionné précédemment, lorsque le cancer progresse, le traitement en continue est souvent considéré. Récemment, nous avons débuté l'analyse de traitements intrathécaux en continue avec le JMV-431, agoniste sélectif NTS2. Les résultats obtenus sont, jusqu'à maintenant, non concluants et ce probablement à cause des doses sélectionnées qui ne semblent pas optimales pour ce type d'administration. Davantage d'investigations et de recherches devront être effectuées pour déterminer la dose optimale

dans le but d'observer des effets analgésiques. Par contre, l'injection intrathécale en continue chez l'humain, malgré l'évolution de la technique, demeure une intervention délicate et invasive. Pour l'instant, seule cette voie d'administration est envisagée pour les agonistes sélectifs NTS2, car aucun ne parvient à passer la barrière hémato-encéphalique. La découverte d'un tel agoniste faciliterait la prise en continue et l'administration par voie systémique ou orale. Récemment, un agoniste sélectif NTS2, le NT79, traversant la barrière hémato-encéphalique, a été décrit (Boules *et al.*, 2011). Il serait donc pertinent d'évaluer cet agoniste dans notre modèle pour pouvoir le faire passer aux autres étapes du processus pré-clinique.

Le co-traitement de la douleur cancéreuse osseuse par deux drogues administrées à faible dose est de plus en plus mentionné dans la littérature. Ce type de traitement engendre un soulagement efficace de la douleur tout en limitant les effets secondaires. Récemment, un effet analgésique synergique en douleur tonique a été décrit suite à la co-administration de la morphine et du NT79 (Boules *et al.*, 2011). De plus, la combinaison de la morphine et d'un agoniste neurotensinergique aurait le potentiel de diminuer l'apparition d'effets secondaires et ce non seulement à cause des faibles doses utilisées. En effet, il a été démontré que la NT peut augmenter la motilité intestinale ce qui pourrait contrer la constipation induite par la morphine injectée par voie systémique (Ferris, 1989, Mantyh *et al.*, 2002). Dépendamment de la combinaison, le co-traitement peut aussi cibler différents aspects de la douleur cancéreuse osseuse tels que la douleur et la dégradation osseuse. Par exemple, un bisphosphonate peut être jumelé à de la chimiothérapie pour diminuer la destruction de la matrice osseuse et la croissance tumorale (Ishiwata *et al.*, 2011; Kaklamani *et al.*, 2011; Link *et al.*, 2007; Neville-Webbe et Coleman, 2010; Zafeirakis *et al.*, 2009). Il serait alors intéressant de jumeler un agoniste sélectif NTS2 avec le tamoxifène ou un bisphosphonate.

La douleur chronique, telle que la douleur cancéreuse osseuse, engendre des co-morbidités augmentant ainsi la prévalence de certaines conditions (ex : troubles de l'humeur et anxiété) qui nécessitent un traitement parallèle à celui de la douleur (McWilliams *et al.*, 2003; Von Korff *et al.*, 2005). Puisque la neurotensine induit différents effets centraux et périphériques dont des effets reliées à des maladies mentales, il serait donc intéressant de

vérifier le potentiel des agonistes neurotensinergiques pour le traitement simultané de la douleur chronique et ses co-morbidités (Feifel *et al.*, 1999; Mechanic *et al.*, 2009).

CONCLUSION

Pour étudier toutes les facettes d'une pathologie, plusieurs modèles doivent être étudiés. C'est pourquoi nous avons développé un nouveau modèle de douleur cancéreuse osseuse se rapprochant de certains aspects cliniques incluant la présence de cellules cancéreuses du cancer du sein syngéniques et l'atteinte du fémur. Ce modèle nous a permis d'étudier l'implication des récepteurs NTS1 et NTS2 en douleur cancéreuse osseuse à l'aide d'animaux invalidés pour ces récepteurs. De plus, notre modèle nous a donné l'opportunité d'évaluer le potentiel analgésique des agonistes neurotensinergiques dans une pathologie encore difficile à traiter. Suite à de nombreux tests comportementaux, d'analyses osseuses et d'études de l'activité neuronale spinale, le récepteur NTS2 s'est révélé être une alternative à considérer pour soulager la douleur cancéreuse osseuse.

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Philippe Sarret, de m'avoir permis de continuer mes études dans son laboratoire sur un projet qui me tenait à coeur. J'ai ainsi pu bénéficier de ton expertise pendant quelques années supplémentaires. De plus, j'ai eu l'opportunité d'apprendre davantage de connaissances et de techniques en douleur tout en gardant une motivation élevée tout au long de mes études. Merci Philippe d'avoir vu en moi un potentiel scientifique que je doutais avoir et de m'avoir permis d'évoluer au sein de ton laboratoire.

Un merci à tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés au cours des sept dernières années : David Barrière, Nicolas Beaudet, Valérie Bégin-Lavallée, Karine Belleville, Élie Besserer-Offroy, Marc-André Dansereau, Daniel Denis, Jessica Deslauriers, Louis Doré-Savard, Annie Guillemette, Karyn Kirby, Mylène Lafrance, Myriam Lemire, Alexandre Murza, Alexandre Parent, Pascal Tétreault et tous les stagiaires. Vous avez été présents tout au long de mes études graduées pour m'encourager et m'aider dans mes projets et ce à votre façon. Nous avons bâti au fil des années un fort esprit d'équipe où il était motivant et agréable d'apprendre et où l'entraide était mise de l'avant. Mes années au laboratoire m'ont donc permis de développer de belles relations de travail, mais aussi des amitiés qui me sont chères et qui, je l'espère, continueront malgré le fait que nos chemins professionnels se séparent.

Au département de physiologie, j'aimerais remercier Denise, Christiane et Jean pour leur aide au cours des dernières années. Je veux aussi remercier les laboratoires avec lesquels j'ai collaboré, en particulier celui du Dr Louis Gendron, ainsi que le personnel du Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke, du Centre de Recherche sur le Tissu Osseux et le Parodonte et du service de pathologie du CHUS.

D'un côté plus personnel, je voudrais remercier ma famille et plus particulièrement mes parents et mon frère. Papa et maman, vous avez toujours été présents par votre soutien, vos encouragements et votre écoute malgré la distance qui nous sépare. Jean-Philippe, tu as vécu les derniers mois de mon doctorat de plus près et tu as su, à ta façon, me faire réfléchir sur mes décisions et me motiver. Je suis convaincue que votre support a été essentiel pour la réussite de mes études universitaires.

Un merci à mes amis gaspésiens et sherbrookoïses. Nos chemins se sont un jour croisés et nous avons partagé les meilleurs comme les moins bons moments que la vie nous a apportés. Malgré le fait que la vie nous a menés dans des villes ou des pays différents, vous avez toujours été présents et à l'écoute. Vous avez su être de bons conseils et me changer les idées quand j'en avais besoin.

En terminant, je voudrais remercier Dr Louis Gendron, Dr Caroline Saucier et Dr Yves St-Pierre d'avoir accepté de faire partie de mon jury d'évaluation de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce document.

RÉFÉRENCES (THÈSE ET ARTICLE PUBLIÉ)

- Abbadie, C., Lombard, M. C., Morain, F., Besson, J. M., 1992. Fos-like immunoreactivity in the rat superficial dorsal horn induced by formalin injection in the forepaw: effects of dorsal rhizotomies. *Brain Res* 578, 17-25.
- Abbott, F. V., Franklin, K. B., Ludwick, R. J., Melzack, R., 1981. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. *Pharmacol Biochem Behav* 15, 637-640.
- Abbott, F. V., Franklin, K. B., Westbrook, R. F., 1995. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 60, 91-102.
- al-Rodhan, N. R., Richelson, E., Gilbert, J. A., McCormick, D. J., Kanba, K. S., Pfenning, M. A., Nelson, A., Larson, E. W., Yaksh, T. L., 1991. Structure-antinociceptive activity of neurotensin and some novel analogues in the periaqueductal gray region of the brainstem. *Brain Res* 557, 227-235.
- Aldridge, S. E., Lennard, T. W., Williams, J. R., Birch, M. A., 2005. Vascular endothelial growth factor acts as an osteolytic factor in breast cancer metastases to bone. *Br J Cancer* 92, 1531-1537.
- Alexander, M. J., Leeman, S. E., 1998. Widespread expression in adult rat forebrain of mRNA encoding high-affinity neurotensin receptor. *J Comp Neurol* 402, 475-500.
- Almenoff, J., Wilk, S., Orlowski, M., 1981. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 102, 206-214.
- Aloisi, A. M., Bonifazi, M., 2006. Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav* 50, 1-7.
- American Cancer Society, *Information and Resources for Cancer: Breast, Colon, Prostate, Lung and Other Forms*, [En ligne], www.cancer.org (page consultée le 15 janvier 2012).
- Armamento-Villareal, R., Napoli, N., Diemer, K., Watkins, M., Civitelli, R., Teitelbaum, S., Novack, D., 2009. Bone turnover in bone biopsies of patients with low-energy cortical fractures receiving bisphosphonates: a case series. *Calcif Tissue Int* 85, 37-44.
- Aslakson, C. J., Miller, F. R., 1992. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 52, 1399-1405.

- Asselin, M. L., Dubuc, I., Coquerel, A., Costentin, J., 2001. Localization of neurotensin NTS2 receptors in rat brain, using [³H] levocabastine. *Neuroreport* 12, 1087-1091.
- Baamonde, A., Lastra, A., Juarez, L., Garcia, V., Hidalgo, A., Menendez, L., 2005. Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372, 213-219.
- Barelli, H., Fox-Threlkeld, J. E., Dive, V., Daniel, E. E., Vincent, J. P., Checler, F., 1994. Role of endopeptidase 3.4.24.16 in the catabolism of neurotensin, in vivo, in the vascularly perfused dog ileum. *Br J Pharmacol* 112, 127-132.
- Behbehani, M. M., Pert, A., 1984. A mechanism for the analgesic effect of neurotensin as revealed by behavioral and electrophysiological techniques. *Brain Res* 324, 35-42.
- Belknap, J. K., Riggan, J., Cross, S., Young, E. R., Gallaher, E. J., Crabbe, J. C., 1998. Genetic determinants of morphine activity and thermal responses in 15 inbred mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav* 59, 353-360.
- Bendre, M. S., Montague, D. C., Peery, T., Akel, N. S., Gaddy, D., Suva, L. J., 2003. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 33, 28-37.
- Berezhnaya, N. M., 2010. Interaction between tumor and immune system: the role of tumor cell biology. *Exp Oncol* 32, 159-166.
- Bertsche, T., Askoxylakis, V., Habl, G., Laidig, F., Kaltschmidt, J., Schmitt, S. P., Ghaderi, H., Bois, A. Z., Milker-Zabel, S., Debus, J., Bardenheuer, H. J., Haefeli, W. E., 2009. Multidisciplinary pain management based on a computerized clinical decision support system in cancer pain patients. *Pain* 147, 20-28.
- Betancur, C., Canton, M., Burgos, A., Labeeuw, B., Gully, D., Rostene, W., Pelaprat, D., 1998. Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [³H]SR 142948A, in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 343, 67-77.
- Bissette, G., Nemeroff, C. B., Loosen, P. T., Prange, A. J., Jr., Lipton, M. A., 1976. Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. *Nature* 262, 607-609.
- Bloom, A. P., Jimenez-Andrade, J. M., Taylor, R. N., Castaneda-Corral, G., Kaczmaraska, M. J., Freeman, K. T., Coughlin, K. A., Ghilardi, J. R., Kuskowski, M. A., Mantyh, P. W., 2011. Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. *J Pain* 12, 698-711.

- Botto, J. M., Guillemare, E., Vincent, J. P., Mazella, J., 1997. Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. *Neurosci Lett* 223, 193-196.
- Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W., Beaudet, A., 1996. Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J Comp Neurol* 373, 76-89.
- Boules, M., Johnston, H., Tozy, J., Smith, K., Li, Z., Richelson, E., 2011. Analgesic synergy of neurotensin receptor subtype 2 agonist NT79 and morphine. *Behav Pharmacol* 22, 573-581.
- Boules, M., McMahon, B., Wang, R., Warrington, L., Stewart, J., Yerbury, S., Fauq, A., McCormick, D., Richelson, E., 2003. Selective tolerance to the hypothermic and anticonvulsant effects of a neurotensin analog that crosses the blood-brain barrier. *Brain Res* 987, 39-48.
- Boules, M., Shaw, A., Liang, Y., Barbut, D., Richelson, E., 2009. NT69L, a novel analgesic, shows synergy with morphine. *Brain Res* 1294, 22-28.
- Bozou, J. C., Amar, S., Vincent, J. P., Kitabgi, P., 1986. Neurotensin-mediated inhibition of cyclic AMP formation in neuroblastoma N1E115 cells: involvement of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 29, 489-496.
- Bredeloux, P., Costentin, J., Dubuc, I., 2006. Interactions between NTS2 neurotensin and opioid receptors on two nociceptive responses assessed on the hot plate test in mice. *Behav Brain Res* 175, 399-407.
- Buhler, A. V., Choi, J., Proudfit, H. K., Gebhart, G. F., 2005. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 114, 285-294.
- Buhler, A. V., Proudfit, H. K., Gebhart, G. F., 2007. Neurotensin-produced antinociception in the rostral ventromedial medulla is partially mediated by spinal cord norepinephrine. *Pain*.
- Buijs, J. T., Stayrook, K. R., Guise, T. A., 2011. TGF-beta in the Bone Microenvironment: Role in Breast Cancer Metastases. *Cancer Microenviron* 4, 261-281.
- Bussard, K. M., Gay, C. V., Mastro, A. M., 2008. The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev* 27, 41-55.

- Bussard, K. M., Venzon, D. J., Mastro, A. M., 2010. Osteoblasts are a major source of inflammatory cytokines in the tumor microenvironment of bone metastatic breast cancer. *J Cell Biochem* 111, 1138-1148.
- Butkevich, I. P., Vershinina, E. A., 2001. Prenatal stress alters time characteristics and intensity of formalin-induced pain responses in juvenile rats. *Brain Res* 915, 88-93.
- Cain, D. M., Wacnik, P. W., Turner, M., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W. R., Wilcox, G. L., Simone, D. A., 2001. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: changes in excitability and morphology of primary afferent fibers in a murine model of cancer pain. *J Neurosci* 21, 9367-9376.
- Cairns, B. E., Gazerani, P., 2009. Sex-related differences in pain. *Maturitas* 63, 292-296.
- Canon, J. R., Roudier, M., Bryant, R., Morony, S., Stolina, M., Kostenuik, P. J., Dougall, W. C., 2008. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25, 119-129.
- Cao, F., Gao, F., Xu, A. J., Chen, Z. J., Chen, S. S., Yang, H., Yu, H. H., Mei, W., Liu, X. J., Xiao, X. P., Yang, S. B., Tian, X. B., Wang, X. R., Tian, Y. K., 2010. Regulation of spinal neuroimmune responses by prolonged morphine treatment in a rat model of cancer induced bone pain. *Brain Res* 1326, 162-173.
- Carlsten, H., 2005. Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunol Rev* 208, 194-206.
- Carraway, R., Leeman, S. E., 1973. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248, 6854-6861.
- Carraway, R., Leeman, S. E., 1975. The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J Biol Chem* 250, 1907-1911.
- Carraway, R., Leeman, S. E., 1976. Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach. *J Biol Chem* 251, 7045-7052.
- Carraway, R. E., Plona, A. M., 2006. Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 27, 2445-2460.
- Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D., Heppenstall, P. A., 2009. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One* 4, e7383.
- Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., Massafra, C., Aloisi, A. M., 2003. Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 24.

Chabry, J., Botto, J. M., Nouel, D., Beaudet, A., Vincent, J. P., Mazella, J., 1995. Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J Biol Chem* 270, 2439-2442.

Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpesch, B., Le Fur, G., Ferrara, P., Caput, D., 1996. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 386, 91-94.

Chanda, D., Isayeva, T., Kumar, S., Siegal, G. P., Szafran, A. A., Zinn, K. R., Reddy, V. V., Ponnazhagan, S., 2008. Systemic osteoprotegerin gene therapy restores tumor-induced bone loss in a therapeutic model of breast cancer bone metastasis. *Mol Ther* 16, 871-878.

Checler, F., Vincent, J. P., Kitabgi, P., 1986. Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 261, 11274-11281.

Chen, X., Tanner, K., Levine, J. D., 1999. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E2 in the rat. *Neurosci Lett* 267, 105-108.

Cherny, N. I., 2000. The management of cancer pain. *CA Cancer J Clin* 50, 70-116; quiz 117-120.

Cifuentes, N., Pickren, J. W., 1979. Metastases from carcinoma of mammary gland: an autopsy study. *J Surg Oncol* 11, 193-205.

Claing, A., 2004. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins. *Biochem Cell Biol* 82, 610-617.

Clines, G. A., Guise, T. A., 2008. Molecular mechanisms and treatment of bone metastasis. *Expert Rev Mol Med* 10, e7.

Clineschmidt, B. V., McGuffin, J. C., Bunting, P. B., 1979. Neurotensin: antinociceptive action in rodents. *Eur J Pharmacol* 54, 129-139.

Clohisy, D. R., Ogilvie, C. M., Carpenter, R. J., Ramnaraine, M. L., 1996. Localized, tumor-associated osteolysis involves the recruitment and activation of osteoclasts. *J Orthop Res* 14, 2-6.

Coderre, T. J., Abbott, F. V., Melzack, R., 1984. Behavioral evidence in rats for a peptidergic-noradrenergic interaction in cutaneous sensory and vascular function. *Neurosci Lett* 47, 113-118.

Coderre, T. J., Fundytus, M. E., McKenna, J. E., Dalal, S., Melzack, R., 1993. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. *Pain* 54, 43-50.

Coderre, T. J., Yashpal, K., Henry, J. L., 1994. Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistent nociceptive responses in the formalin test. *Neuroreport* 5, 1337-1340.

Coleman, R. E., 1997. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80, 1588-1594.

Coleman, R. E., 2006. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12, 6243s-6249s.

Coleman, R. E., Rubens, R. D., 1987. 3(Amino-1,1-hydroxypropylidene) bisphosphonate (APD) for hypercalcaemia of breast cancer. *Br J Cancer* 56, 465-469.

Cook, C. D., Beardsley, P. M., 2003. The modulatory actions of dopamine D2/3 agonists and antagonists on the locomotor-activating effects of morphine and caffeine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 75, 363-371.

Cross, A. S., Azzopardi, J. G., Krausz, T., van Noorden, S., Polak, J. M., 1985. A morphological and immunocytochemical study of a distinctive variant of ductal carcinoma in-situ of the breast. *Histopathology* 9, 21-37.

Cusack, B., Boules, M., Tyler, B. M., Fauq, A., McCormick, D. J., Richelson, E., 2000. Effects of a novel neurotensin peptide analog given extracranially on CNS behaviors mediated by apomorphine and haloperidol. *Brain Res* 856, 48-54.

Dal Farra, C., Sarret, P., Navarro, V., Botto, J. M., Mazella, J., Vincent, J. P., 2001. Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 92, 503-509.

Davar, G., 2001. Endothelin-1 and metastatic cancer pain. *Pain Med* 2, 24-27.

Davidson, E. M., Carlton, S. M., 1998. Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. *Brain Res* 785, 136-142.

Davies, N. M., 2004. Degradation and metabolism of mometasone furoate in humans: influence of reversible, sequential metabolism, and ionic strength. *J Pharm Sci* 93, 2877-2880.

De Lean, A., Hancock, A. A., Lefkowitz, R. J., 1982. Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 21, 5-16.

de Oliveira, C. M., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., Salomao, R., 2011. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol* 61, 255-259, 260-255, 137-242.

Denes, A., Boldogkoi, Z., Uhreczky, G., Hornyak, A., Rusvai, M., Palkovits, M., Kovacs, K. J., 2005. Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. *Neuroscience* 134, 947-963.

Dickenson, A. H., Sullivan, A. F., 1987. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 30, 349-360.

Dicou, E., Vincent, J. P., Mazella, J., 2004. Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res* 78, 92-99.

Doak, G. J., Sawynok, J., 1997. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience* 80, 939-949.

Dobner, P. R., 2005. Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 62, 1946-1963.

Dobner, P. R., 2006. Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 27, 2405-2414.

Domchek, S. M., Younger, J., Finkelstein, D. M., Seiden, M. V., 2000. Predictors of skeletal complications in patients with metastatic breast carcinoma. *Cancer* 89, 363-368.

Dong, Y., Mao-Ying, Q. L., Chen, J. W., Yang, C. J., Wang, Y. Q., Tan, Z. M., 2011. Involvement of EphB1 receptor/ephrinB1 ligand in bone cancer pain. *Neurosci Lett* 496, 163-167.

Donovan-Rodriguez, T., Dickenson, A. H., Urch, C. E., 2005. Gabapentin normalizes spinal neuronal responses that correlate with behavior in a rat model of cancer-induced bone pain. *Anesthesiology* 102, 132-140.

Donovan-Rodriguez, T., Urch, C. E., Dickenson, A. H., 2006. Evidence of a role for descending serotonergic facilitation in a rat model of cancer-induced bone pain. *Neurosci Lett* 393, 237-242.

Dore-Savard, L., Otis, V., Belleville, K., Lemire, M., Archambault, M., Tremblay, L., Beaudoin, J. F., Beaudet, N., Lecomte, R., Lepage, M., Gendron, L., Sarret, P., 2010. Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS One* 5, e13774.

Dore-Savard, L., Roussy, G., Dansereau, M. A., Collingwood, M. A., Lennox, K. A., Rose, S. D., Beaudet, N., Behlke, M. A., Sarret, P., 2008. Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Mol Ther* 16, 1331-1339.

- Dubuc, I., Costentin, J., Terranova, J. P., Barnouin, M. C., Soubrie, P., Le Fur, G., Rostene, W., Kitabgi, P., 1994. The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 112, 352-354.
- Dubuc, I., Remande, S., Costentin, J., 1999a. The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 381, 9-12.
- Dubuc, I., Sarret, P., Labbe-Jullie, C., Botto, J. M., Honore, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J. P., Kitabgi, P., Mazella, J., 1999b. Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci* 19, 503-510.
- Dubuc, I., Sarret, P., Labbe-Jullie, C., Botto, J. M., Honore, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J. P., Kitabgi, P., Mazella, J., 1999c. Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci* 19, 503-510.
- Dubuisson, D., Dennis, S. G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.
- Dudek, A. Z., Zwolak, P., Jasinski, P., Terai, K., Gallus, N. J., Ericson, M. E., Farassati, F., 2008. Protein kinase C-beta inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl) enhances radiation control of murine breast cancer in an orthotopic model of bone metastasis. *Invest New Drugs* 26, 13-24.
- Dunnwald, L. K., Rossing, M. A., Li, C. I., 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 9, R6.
- Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Alifano, M., Souaze, F., Plu-Bureau, G., Chaouat, M., Lavour, A., Hugol, D., Gispach, C., Gompel, A., Forgez, P., 2009. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One* 4, e4223.
- Dworkin, R. H., 2002. An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. *Clin J Pain* 18, 343-349.
- Ehlers, R. A., 2nd, Bonnor, R. M., Wang, X., Hellmich, M. R., Evers, B. M., 1998. Signal transduction mechanisms in neurotensin-mediated cellular regulation. *Surgery* 124, 239-246; discussion 246-237.
- El Mouedden, M., Meert, T. F., 2005. Evaluation of pain-related behavior, bone destruction and effectiveness of fentanyl, sufentanil, and morphine in a murine model of cancer pain. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 109-119.

- El Mouedden, M., Meert, T. F., 2007. The impact of the opioids fentanyl and morphine on nociception and bone destruction in a murine model of bone cancer pain. *Pharmacol Biochem Behav* 87, 30-40.
- Elde, R., Schalling, M., Ceccatelli, S., Nakanishi, S., Hokfelt, T., 1990. Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett* 120, 134-138.
- Elek, J., Pinzon, W., Park, K. H., Narayanan, R., 2000. Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Res* 20, 53-58.
- Evers, B. M., Izukura, M., Chung, D. H., Parekh, D., Yoshinaga, K., Greeley, G. H., Jr., Uchida, T., Townsend, C. M., Jr., Thompson, J. C., 1992. Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenterology* 103, 86-91.
- Ewens, A., Luo, L., Berleth, E., Alderfer, J., Wollman, R., Hafeez, B. B., Kanter, P., Mihich, E., Ehrke, M. J., 2006. Doxorubicin plus interleukin-2 chemoimmunotherapy against breast cancer in mice. *Cancer Res* 66, 5419-5426.
- Fanselow, M. S., 1984. Shock-induced analgesia on the formalin test: effects of shock severity, naloxone, hypophysectomy, and associative variables. *Behav Neurosci* 98, 79-95.
- Fanselow, M. S., 1985. Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. *Behav Neurosci* 99, 589-592.
- Fassio, A., Evans, G., Grisshammer, R., Bolam, J. P., Mimmack, M., Emson, P. C., 2000. Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 39, 1430-1442.
- Feifel, D., Reza, T. L., Wustrow, D. J., Davis, M. D., 1999. Novel antipsychotic-like effects on prepulse inhibition of startle produced by a neurotensin agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 710-713.
- Ferris, C.F. (1989) Neurotensin un handbook of physiology section 6 : the gastrointestinal system. : 559-586
- Franklin, K. B., Abbott, F. V., 1993. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABAA receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 46, 661-666.
- Gailly, P., Najimi, M., Hermans, E., 2000. Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett* 483, 109-113.
- Gaumond, I., Arsenault, P., Marchand, S., 2002. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res* 958, 139-145.

Gaumond, I., Arsenault, P., Marchand, S., 2005. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res* 1052, 105-111.

Gaumond, I., Spooner, M. F., Marchand, S., 2007. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience* 146, 366-374.

Gebhart, G. F., 2004. Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 729-737.

Geis, C., Graulich, M., Wissmann, A., Hagenacker, T., Thomale, J., Sommer, C., Schafers, M., 2010. Evoked pain behavior and spinal glia activation is dependent on tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in a mouse model of bone cancer pain. *Neuroscience* 169, 463-474.

Gendron, L., Perron, A., Payet, M. D., Gallo-Payet, N., Sarret, P., Beaudet, A., 2004. Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol* 66, 1421-1430.

Goblirsch, M. J., Zwolak, P., Clohisy, D. R., 2005. Advances in understanding bone cancer pain. *J Cell Biochem* 96, 682-688.

Gordon-Williams, R. M., Dickenson, A. H., 2007. Central neuronal mechanisms in cancer-induced bone pain. *Curr Opin Support Palliat Care* 1, 6-10.

Gu, J. W., Young, E., Busby, B., Covington, J., Tan, W., Johnson, J. W., 2009. Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis and growth of breast cancer in female mice. *Cancer Biol Ther* 8.

Guillemette, A., Dansereau, M. A., Beaudet, N., Richelson, E., Sarret, P., 2011. Intrathecal administration of NTS1 agonists reverses nociceptive behaviors in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain*.

Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J. C., Poncelet, M., Gueudet, C., Heulme, M., Leyris, R., Brouard, A., et al., 1993. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 65-69.

Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, A., Poncelet, M., Steinberg, R., Suaud-Chagny, M. F., Santucci, V., Vita, N., Pecceu, F., Labbe-Jullie, C., Kitabgi, P., Soubrie, P., Le Fur, G., Maffrand, J. P., 1997. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 802-812.

Hahn, M., Vogel, M., Pompesius-Kempa, M., Delling, G., 1992. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 13, 327-330.

Hald, A., Ding, M., Egerod, K., Hansen, R. R., Konradsen, D., Jorgensen, S. G., Atalay, B., Nasser, A., Bjerrum, O. J., Heegaard, A. M., 2008. Differential effects of repeated low dose treatment with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in experimental models of bone cancer pain and neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 91, 38-46.

Hald, A., Hansen, R. R., Thomsen, M. W., Ding, M., Croucher, P. I., Gallagher, O., Ebetino, F. H., Kassem, M., Heegaard, A. M., 2009a. Cancer-induced bone loss and associated pain-related behavior is reduced by risedronate but not its phosphonocarboxylate analog NE-10790. *Int J Cancer* 125, 1177-1185.

Hald, A., Nedergaard, S., Hansen, R. R., Ding, M., Heegaard, A. M., 2009b. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. *Eur J Pain* 13, 138-145.

Halvorson, K. G., Sevcik, M. A., Ghilardi, J. R., Sullivan, L. J., Koewler, N. J., Bauss, F., Mantyh, P. W., 2008. Intravenous ibandronate rapidly reduces pain, neurochemical indices of central sensitization, tumor burden, and skeletal destruction in a mouse model of bone cancer. *J Pain Symptom Manage* 36, 289-303.

Hamaguchi, T., Wakabayashi, H., Matsumine, A., Sudo, A., Uchida, A., 2011. TNF inhibitor suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 407, 525-530.

Hamamoto, D. T., Khasabov, S. G., Cain, D. M., Simone, D. A., 2008. Tumor-evoked sensitization of C nociceptors: a role for endothelin. *J Neurophysiol* 100, 2300-2311.

Hameed, M., Dorfman, H., 2011. Primary malignant bone tumors--recent developments. *Semin Diagn Pathol* 28, 86-101.

Hansen, R. R., Nielsen, C. K., Nasser, A., Thomsen, S. I., Eghorn, L. F., Pham, Y., Schulenburg, C., Syberg, S., Ding, M., Stojilkovic, S. S., Jorgensen, N. R., Heegaard, A. M., 2011. P2X7 receptor-deficient mice are susceptible to bone cancer pain. *Pain* 152, 1766-1776.

Harvey, H. A., Cream, L. R., 2007. Biology of bone metastases: causes and consequences. *Clin Breast Cancer* 7 Suppl 1, S7-S13.

Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E., Klagsbrun, M., 1986. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261, 12665-12674.

Henry, J. L., Yashpal, K., Pitcher, G. M., Coderre, T. J., 1999. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. *Pain* 82, 57-63.

Holland, L. N., Goldstein, B. D., 1990. Changes of substance P-like immunoreactivity in the dorsal horn are associated with the 'phasic' behavioral response to a formalin stimulus. *Brain Res* 537, 287-292.

Honore, P., Luger, N. M., Sabino, M. A., Schwei, M. J., Rogers, S. D., Mach, D. B., O'Keefe P, F., Ramnaraine, M. L., Clohisy, D. R., Mantyh, P. W., 2000a. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med* 6, 521-528.

Honore, P., Mantyh, P. W., 2000. Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain Med* 1, 303-309.

Honore, P., Rogers, S. D., Schwei, M. J., Salak-Johnson, J. L., Luger, N. M., Sabino, M. C., Clohisy, D. R., Mantyh, P. W., 2000b. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98, 585-598.

Hunt, S. P., Pini, A., Evan, G., 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328, 632-634.

Hussein, O., Komarova, S. V., 2011. Breast cancer at bone metastatic sites: recent discoveries and treatment targets. *J Cell Commun Signal* 5, 85-99.

Hwang, J. R., Baek, M. W., Sim, J., Choi, H. S., Han, J. M., Kim, Y. L., Hwang, J. I., Kwon, H. B., Beaudet, N., Sarret, P., Seong, J. Y., 2010. Intermolecular cross-talk between NTR1 and NTR2 neurotensin receptor promotes intracellular sequestration and functional inhibition of NTR1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1007-1013.

Hylden, J. L., Wilcox, G. L., 1983. Antinociceptive action of intrathecal neurotensin in mice. *Peptides* 4, 517-520.

Ishiwata, T., Hirose, T., Hirama, M., Miura, K., Iwakami, S., Tominaga, S., Adachi, M., Takahashi, K., 2011. A feasibility study of zoledronic acid combined with carboplatin/nedaplatin plus paclitaxel in patients with non-small cell lung cancer with bone metastases. *Tumori* 97, 568-572.

Ishizuka, J., Townsend, C. M., Jr., Thompson, J. C., 1993. Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg* 217, 439-445; discussion 446.

Isono, M., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Sakagami, H., Uematsu, S., Akira, S., DeClerck, Y. A., Okamoto, H., Majima, M., 2011. Microsomal prostaglandin E synthase-1 enhances bone cancer growth and bone cancer-related pain behaviors in mice. *Life Sci* 88, 693-700.

Jarvis, M. F., Honore, P., Shieh, C. C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X. F., Kort, M., Carroll, W., Marron, B., Atkinson, R., Thomas, J., Liu, D., Krambis, M., Liu, Y., McGaraughty, S., Chu, K., Roeloffs, R., Zhong, C., Mikusa, J. P., Hernandez, G., Gauvin, D., Wade, C., Zhu, C., Pai, M., Scanio, M., Shi, L., Drizin, I., Gregg, R., Matulenko, M., Hakeem, A., Gross, M., Johnson, M., Marsh, K., Wagoner, P. K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R., Krafft, D. S., 2007. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8520-8525.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M. J., 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-249.

Jensen, A. O., Jacobsen, J. B., Norgaard, M., Yong, M., Fryzek, J. P., Sorensen, H. T., 2011. Incidence of bone metastases and skeletal-related events in breast cancer patients: a population-based cohort study in Denmark. *BMC Cancer* 11, 29.

Kaklamani, V. G., Siziopikou, K., Scholtens, D., Lacouture, M., Gordon, J., Uthe, R., Meservey, C., Hansen, N., Khan, S. A., Jeruss, J. S., Bethke, K., Cianfrocca, M., Rosen, S., Von Roenn, J., Wayne, J., Parimi, V., Jovanovic, B., Gradishar, W., 2011. Pilot neoadjuvant trial in HER2 positive breast cancer with combination of nab-paclitaxel and lapatinib. *Breast Cancer Res Treat.*

Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., Massague, J., 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3, 537-549.

Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J. K., Ji, R. R., 2008. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 28, 5189-5194.

Khasabov, S. G., Hamamoto, D. T., Harding-Rose, C., Simone, D. A., 2007. Tumor-evoked hyperalgesia and sensitization of nociceptive dorsal horn neurons in a murine model of cancer pain. *Brain Res* 1180, 7-19.

Khasabova, I. A., Chandiramani, A., Harding-Rose, C., Simone, D. A., Seybold, V. S., 2011. Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *Pharmacol Res* 64, 60-67.

Khasabova, I. A., Khasabov, S. G., Harding-Rose, C., Coicou, L. G., Seybold, B. A., Lindberg, A. E., Steevens, C. D., Simone, D. A., Seybold, V. S., 2008. A decrease in anandamide signaling contributes to the maintenance of cutaneous mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *J Neurosci* 28, 11141-11152.

Kinder, M., Chislock, E., Bussard, K. M., Shuman, L., Mastro, A. M., 2008. Metastatic breast cancer induces an osteoblast inflammatory response. *Exp Cell Res* 314, 173-183.

King T. et Porreca F. 2010. Opioids in Cancer Pain : New Considerations. *IASP (Pain Clinical Updates)*, XVIII (1), 1-5.

King, T., Vardanyan, A., Majuta, L., Melemedjian, O., Nagle, R., Cress, A. E., Vanderah, T. W., Lai, J., Porreca, F., 2007. Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. *Pain* 132, 154-168.

Kirou-Mauro, A. M., Hird, A., Wong, J., Sinclair, E., Barnes, E. A., Tsao, M., Danjoux, C., Chow, E., 2009. Has pain management in cancer patients with bone metastases improved? A seven-year review at an outpatient palliative radiotherapy clinic. *J Pain Symptom Manage* 37, 77-84.

Kissin, I., 2010. The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesth Analg* 110, 780-789.

Kitabgi, P., 2002. Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5, 764-776.

Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengelov, H., Borregaard, N., 1993. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268, 10425-10432.

Koek, W., France, C. P., Javors, M. A., 2012. Morphine-induced motor stimulation, motor incoordination, and hypothermia in adolescent and adult mice. *Psychopharmacology (Berl)* 219, 1027-1037.

Kohno, T., Moore, K. A., Baba, H., Woolf, C. J., 2003. Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol* 548, 131-138.

Kozlow, W., Guise, T. A., 2005. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 169-180.

Kundu, N., Yang, Q., Dorsey, R., Fulton, A. M., 2001. Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 93, 681-686.

Kuribara, H., 1995. Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. *Eur J Pharmacol* 275, 251-258.

- La Rocca, G., Pucci-Minafra, I., Marrazzo, A., Taormina, P., Minafra, S., 2004. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer* 90, 1414-1421.
- Labbe-Jullie, C., Dubuc, I., Brouard, A., Doulut, S., Bourdel, E., Pelaprat, D., Mazella, J., Martinez, J., Rostene, W., Costentin, J., et al., 1994. In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 268, 328-336.
- Lafrance, M., Roussy, G., Belleville, K., Maeno, H., Beaudet, N., Wada, K., Sarret, P., 2010. Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia. *Neuroscience* 166, 639-652.
- Larkins, T. L., Nowell, M., Singh, S., Sanford, G. L., 2006. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 6, 181.
- Leah, J. D., Sandkuhler, J., Herdegen, T., Murashov, A., Zimmermann, M., 1992. Potentiated expression of FOS protein in the rat spinal cord following bilateral noxious cutaneous stimulation. *Neuroscience* 48, 525-532.
- Lepee-Lorgeoux, I., Betancur, C., Rostene, W., Pelaprat, D., 1999. Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res* 113, 115-131.
- Levine, J. D., Alessandri-Haber, N., 2007. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta* 1772, 989-1003.
- Lingueglia, E., de Weille, J. R., Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., Lazdunski, M., 1997. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem* 272, 29778-29783.
- Link, J. S., Waisman, J. R., Nguyen, B., Jacobs, C. I., 2007. Bevacizumab and albumin-bound paclitaxel treatment in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 7, 779-783.
- Lippman, M. E., Dickson, R. B., 1989. Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog Horm Res* 45, 383-435; discussion 435-340.
- Lozano-Ondoua, A. N., Wright, C., Vardanyan, A., King, T., Largent-Milnes, T. M., Nelson, M., Jimenez-Andrade, J. M., Mantyh, P. W., Vanderah, T. W., 2010. A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sci* 86, 646-653.
- Luger, N. M., Honore, P., Sabino, M. A., Schwei, M. J., Rogers, S. D., Mach, D. B., Clohisy, D. R., Mantyh, P. W., 2001. Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Res* 61, 4038-4047.

- Luger, N. M., Mach, D. B., Sevcik, M. A., Mantyh, P. W., 2005. Bone cancer pain: from model to mechanism to therapy. *J Pain Symptom Manage* 29, S32-46.
- Luger, N. M., Sabino, M. A., Schwei, M. J., Mach, D. B., Pomonis, J. D., Keyser, C. P., Rathbun, M., Clohisy, D. R., Honore, P., Yaksh, T. L., Mantyh, P. W., 2002. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. *Pain* 99, 397-406.
- Mach, D. B., Rogers, S. D., Sabino, M. C., Luger, N. M., Schwei, M. J., Pomonis, J. D., Keyser, C. P., Clohisy, D. R., Adams, D. J., O'Leary, P., Mantyh, P. W., 2002. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* 113, 155-166.
- Maeno, H., Yamada, K., Santo-Yamada, Y., Aoki, K., Sun, Y. J., Sato, E., Fukushima, T., Ogura, H., Araki, T., Kamichi, S., Kimura, I., Yamano, M., Maeno-Hikichi, Y., Watase, K., Aoki, S., Kiyama, H., Wada, E., Wada, K., 2004. Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, *Ntsr1* or *Ntsr2*, reveals a novel function for *Ntsr2* in thermal nociception. *Brain Res* 998, 122-129.
- Mantyh, P. W., 2006. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nat Rev Neurosci* 7, 797-809.
- Mantyh, P. W., Clohisy, D. R., Koltzenburg, M., Hunt, S. P., 2002. Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2, 201-209.
- Martin, C. D., Jimenez-Andrade, J. M., Ghilardi, J. R., Mantyh, P. W., 2007. Organization of a unique net-like meshwork of CGRP+ sensory fibers in the mouse periosteum: implications for the generation and maintenance of bone fracture pain. *Neurosci Lett* 427, 148-152.
- Martin, S., Dicou, E., Vincent, J. P., Mazella, J., 2005. Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells. *J Neurosci Res* 81, 322-326.
- Martin, S., Vincent, J. P., Mazella, J., 2002. Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *J Cell Sci* 115, 165-173.
- Mastro, A. M., Gay, C. V., Welch, D. R., 2003. The skeleton as a unique environment for breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 20, 275-284.
- Matthies, B. K., Franklin, K. B., 1992. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain* 51, 199-206.
- Matthies, B. K., Franklin, K. B., 1995. Effects of partial decortication on opioid analgesia in the formalin test. *Behav Brain Res* 67, 59-66.

May, A., 2008. Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain* 137, 7-15.

Mayo Clinic, *Mayo Clinic medical information and tools for healthy living*, [En ligne], www.mayoclinic.com (page consultée le 15 janvier 2012).

Mazella, J., 2001. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13, 1-6.

Mazella, J., Botto, J. M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., Vincent, J. P., 1996. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16, 5613-5620.

Mazella, J., Chabry, J., Zsurgur, N., Vincent, J. P., 1989. Purification of the neurotensin receptor from mouse brain by affinity chromatography. *J Biol Chem* 264, 5559-5563.

Mazella, J., Vincent, J. P., 2006. Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides* 27, 2469-2475.

Mazella, J., Zsurgur, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J. P., Vincent, J. P., 1998. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 273, 26273-26276.

Mazo, I. B., Gutierrez-Ramos, J. C., Frenette, P. S., Hynes, R. O., Wagner, D. D., von Andrian, U. H., 1998. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 188, 465-474.

Mazo, I. B., von Andrian, U. H., 1999. Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J Leukoc Biol* 66, 25-32.

McLaughlin, C. R., Lichtman, A. H., Fanselow, M. S., Cramer, C. P., 1990. Tonic nociception in neonatal rats. *Pharmacol Biochem Behav* 36, 859-862.

McWilliams, L. A., Cox, B. J., Enns, M. W., 2003. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain* 106, 127-133.

Mechanic, J. A., Sutton, J. E., Berson, A. E., Wu, X., Kwan, J., Schreiber, R., Pang, Z., Button, D. C., 2009. Involvement of the neurotensin receptor 1 in the behavioral effects of two neurotensin agonists, NT-2 and NT69L: lack of hypothermic, antinociceptive and antipsychotic actions in receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 466-475.

Medhurst, S. J., Walker, K., Bowes, M., Kidd, B. L., Glatt, M., Muller, M., Hattenberger, M., Vaxelaire, J., O'Reilly, T., Wotherspoon, G., Winter, J., Green, J., Urban, L., 2002. A rat model of bone cancer pain. *Pain* 96, 129-140.

- Menendez, L., Lastra, A., Fresno, M. F., Llames, S., Meana, A., Hidalgo, A., Baamonde, A., 2003. Initial thermal heat hypoalgesia and delayed hyperalgesia in a murine model of bone cancer pain. *Brain Res* 969, 102-109.
- Menetrey, D., Gannon, A., Levine, J. D., Basbaum, A. I., 1989. Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J Comp Neurol* 285, 177-195.
- Mercadante, S., Ferrera, P., Villari, P., Arcuri, E., 2003. Hyperalgesia: an emerging iatrogenic syndrome. *J Pain Symptom Manage* 26, 769-775.
- Mercadante, S., Fulfaro, F., 2007. Management of painful bone metastases. *Curr Opin Oncol* 19, 308-314.
- Mercadante, S., Villari, P., Casuccio, A., 2011. An Italian survey on the attitudes in treating breakthrough cancer pain in hospice. *Support Care Cancer* 19, 979-983.
- Mercer, R. R., Mastro, A. M., 2005. Cytokines secreted by bone-metastatic breast cancer cells alter the expression pattern of f-actin and reduce focal adhesion plaques in osteoblasts through PI3K. *Exp Cell Res* 310, 270-281.
- Meuser, T., Pietruck, C., Radbruch, L., Stute, P., Lehmann, K. A., Grond, S., 2001. Symptoms during cancer pain treatment following WHO-guidelines: a longitudinal follow-up study of symptom prevalence, severity and etiology. *Pain* 93, 247-257.
- Miao, X. R., Gao, X. F., Wu, J. X., Lu, Z. J., Huang, Z. X., Li, X. Q., He, C., Yu, W. F., 2010. Bilateral downregulation of Nav1.8 in dorsal root ganglia of rats with bone cancer pain induced by inoculation with Walker 256 breast tumor cells. *BMC Cancer* 10, 216.
- Millan, M. J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57, 1-164.
- Mobarakeh, J. I., Sakurada, S., Katsuyama, S., Kutsuwa, M., Kuramasu, A., Lin, Z. Y., Watanabe, T., Hashimoto, Y., Yanai, K., 2000. Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur J Pharmacol* 391, 81-89.
- Mogil, J. S., Davis, K. D., Derbyshire, S. W., 2010. The necessity of animal models in pain research. *Pain* 151, 12-17.
- Molander, C., Xu, Q., Grant, G., 1984. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230, 133-141.
- Monnier, A., 2007. Clinical management of adverse events in adjuvant therapy for hormone-responsive early breast cancer. *Ann Oncol* 18 Suppl 8, viii36-44.

Munson, P. J., Rodbard, D., 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107, 220-239.

Nadler, R. B., Koch, A. E., Calhoun, E. A., Campbell, P. L., Pruden, D. L., Bennett, C. L., Yarnold, P. R., Schaeffer, A. J., 2000. IL-1beta and TNF-alpha in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *J Urol* 164, 214-218.

Nagae, M., Hiraga, T., Yoneda, T., 2007. Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. *J Bone Miner Metab* 25, 99-104.

Najimi, M., Gailly, P., Maloteaux, J. M., Hermans, E., 2002. Distinct regions of C-terminus of the high affinity neurotensin receptor mediate the functional coupling with pertussis toxin sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett* 512, 329-333.

Nemeroff, C. B., Osbahr, A. J., 3rd, Manberg, P. J., Ervin, G. N., Prange, A. J., Jr., 1979. Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5368-5371.

Nesland, J. M., Ottestad, L., Heikilla, R., Holm, R., Tveit, K., Borresen, A. L., 1991. C-erbB-2 protein and neuroendocrine expression in breast carcinomas. *Anticancer Res* 11, 161-167.

Neville-Webbe, H. L., Coleman, R. E., 2010. Bisphosphonates and RANK ligand inhibitors for the treatment and prevention of metastatic bone disease. *Eur J Cancer* 46, 1211-1222.

Niiyama, Y., Kawamata, T., Yamamoto, J., Furuse, S., Namiki, A., 2009. SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth* 102, 251-258.

Niiyama, Y., Kawamata, T., Yamamoto, J., Omote, K., Namiki, A., 2007. Bone cancer increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 148, 560-572.

Ninkovic, M., Hunt, S. P., Kelly, J. S., 1981. Effect of dorsal rhizotomy on the autoradiographic distribution of opiate and neurotensin receptors and neurotensin-like immunoreactivity within the rat spinal cord. *Brain Res* 230, 111-119.

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., Caron, M. G., 2001. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem* 276, 19452-19460.

Okamoto, M., Baba, H., Goldstein, P. A., Higashi, H., Shimoji, K., Yoshimura, M., 2001. Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *J Physiol* 532, 241-250.

Olson, M. W., Bernardo, M. M., Pietila, M., Gervasi, D. C., Toth, M., Kotra, L. P., Massova, I., Mobashery, S., Fridman, R., 2000. Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem* 275, 2661-2668.

Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Namiki, A., 1998. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. *Brain Res* 814, 194-198.

Osbahr, A. J., 3rd, Nemeroff, C. B., Luttinger, D., Mason, G. A., Prange, A. J., Jr., 1981. Neurotensin-induced antinociception in mice: antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 217, 645-651.

Ossipov, M. H., Lai, J., King, T., Vanderah, T. W., Porreca, F., 2005. Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Biopolymers* 80, 319-324.

Otis, V., Sarret, P., Gendron, L., 2011. Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone pain. *Neuroscience* 183, 221-229.

Pantano, F., Zoccoli, A., Iuliani, M., Lanzetta, G., Vincenzi, B., Tonini, G., Santini, D., 2011. New targets, new drugs for metastatic bone pain: a new philosophy. *Expert Opin Emerg Drugs* 16, 403-405.

Parada, C. A., Tambeli, C. H., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H., 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 102, 937-944.

Patel, S., Sumitra, G., Koner, B. C., Saxena, A., 2011. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. *Clin Biochem* 44, 869-872.

Penet, M. F., Gadiya, M. M., Krishnamachary, B., Nimmagadda, S., Pomper, M. G., Artemov, D., Bhujwala, Z. M., 2011. Metabolic signatures imaged in cancer-induced cachexia. *Cancer Res* 71, 6948-6956.

Perron, A., Sharif, N., Sarret, P., Stroh, T., Beaudet, A., 2007. NTS2 modulates the intracellular distribution and trafficking of NTS1 via heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 582-590.

Peters, C. M., Ghilardi, J. R., Keyser, C. P., Kubota, K., Lindsay, T. H., Luger, N. M., Mach, D. B., Schwei, M. J., Sevcik, M. A., Mantyh, P. W., 2005. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Exp Neurol* 193, 85-100.

Peters, C. M., Lindsay, T. H., Pomonis, J. D., Luger, N. M., Ghilardi, J. R., Sevcik, M. A., Mantyh, P. W., 2004. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. *Neuroscience* 126, 1043-1052.

Pettibone, D. J., Hess, J. F., Hey, P. J., Jacobson, M. A., Leviten, M., Lis, E. V., Mallorga, P. J., Pascarella, D. M., Snyder, M. A., Williams, J. B., Zeng, Z., 2002. The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 305-313.

Plunkett, T. A., Smith, P., Rubens, R. D., 2000. Risk of complications from bone metastases in breast cancer. implications for management. *Eur J Cancer* 36, 476-482.

Poinot-Chazel, C., Portier, M., Bouaboula, M., Vita, N., Pecceu, F., Gully, D., Monroe, J. G., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Casellas, P., 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem J* 320 (Pt 1), 145-151.

Porro, C. A., Cavazzuti, M., 1993. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol* 41, 565-607.

Porro, C. A., Cavazzuti, M., Lui, F., Giuliani, D., Pellegrini, M., Baraldi, P., 2003. Independent time courses of supraspinal nociceptive activity and spinally mediated behavior during tonic pain. *Pain* 104, 291-301.

Porro, C. A., Tassinari, G., Facchinetti, F., Panerai, A. E., Carli, G., 1991. Central beta-endorphin system involvement in the reaction to acute tonic pain. *Exp Brain Res* 83, 549-554.

Portenoy, R. K., Bruns, D., Shoemaker, B., Shoemaker, S. A., 2010. Breakthrough pain in community-dwelling patients with cancer pain and noncancer pain, part 1: prevalence and characteristics. *J Opioid Manag* 6, 97-108.

Portenoy, R. K., Lesage, P., 1999. Management of cancer pain. *Lancet* 353, 1695-1700.

Potenzieri, C., Harding-Rose, C., Simone, D. A., 2008. The cannabinoid receptor agonist, WIN 55, 212-2, attenuates tumor-evoked hyperalgesia through peripheral mechanisms. *Brain Res* 1215, 69-75.

Presley, R. W., Menetrey, D., Levine, J. D., Basbaum, A. I., 1990. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 10, 323-335.

Radinsky, R., 1991. Growth factors and their receptors in metastasis. *Semin Cancer Biol* 2, 169-177.

Rauch, F., 2009. Bone biopsy: indications and methods. *Endocr Dev* 16, 49-57.

Ray, S. B., Yaksh, T. L., 2008. Spinal antinociceptive action of loperamide is mediated by opioid receptors in the formalin test in rats. *Neurosci Lett* 448, 260-262.

- Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., Culouscou, J. M., Le Fur, G., Soubrie, P., Caput, D., Shire, D., Kopf, M., Ferrara, P., 2002. Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res* 953, 63-72.
- Reubi, J. C., Waser, B., Schaer, J. C., Laissue, J. A., 1999. Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *Int J Cancer* 82, 213-218.
- Richard, F., Barroso, S., Nicolas-Etheve, D., Kitabgi, P., Labbe-Julie, C., 2001. Impaired G protein coupling of the neurotensin receptor 1 by mutations in extracellular loop 3. *Eur J Pharmacol* 433, 63-71.
- Rizzoli, R., Reginster, J. Y., 2011. Adverse drug reactions to osteoporosis treatments. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4, 593-604.
- Roato, I., Grano, M., Brunetti, G., Colucci, S., Mussa, A., Bertetto, O., Ferracini, R., 2005. Mechanisms of spontaneous osteoclastogenesis in cancer with bone involvement. *FASEB J* 19, 228-230.
- Roodman, G. D., 2004. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350, 1655-1664.
- Roodman, G. D., 2007. Bone-breaking cancer treatment. *Nat Med* 13, 25-26.
- Rosen, P. P., 2008. *Rosen's Breast Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Rosol, T. J., Tannehill-Gregg, S. H., LeRoy, B. E., Mandl, S., Contag, C. H., 2003. Animal models of bone metastasis. *Cancer* 97, 748-757.
- Rostene, W. H., Alexander, M. J., 1997. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 18, 115-173.
- Rousselle, A. V., Heymann, D., 2002. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 30, 533-540.
- Roussy, G., Beaudry, H., Lafrance, M., Belleville, K., Beaudet, N., Wada, K., Gendron, L., Sarret, P., 2010. Altered morphine-induced analgesia in neurotensin type 1 receptor null mice. *Neuroscience* 170, 1286-1294.
- Roussy, G., Dansereau, M. A., Baudisson, S., Ezzoubaa, F., Belleville, K., Beaudet, N., Martinez, J., Richelson, E., Sarret, P., 2009. Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity. *Mol Pain* 5, 38.
- Roussy, G., Dansereau, M. A., Dore-Savard, L., Belleville, K., Beaudet, N., Richelson, E., Sarret, P., 2008. Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *J Neurochem* 105, 1100-1114.

- Rubens, R. D., 1998. Bone metastases--the clinical problem. *Eur J Cancer* 34, 210-213.
- Ryan, S. M., Watkins, L. R., Mayer, D. J., Maier, S. F., 1985. Spinal pain suppression mechanisms may differ for phasic and tonic pain. *Brain Res* 334, 172-175.
- Sabino, M. A., Luger, N. M., Mach, D. B., Rogers, S. D., Schwei, M. J., Mantyh, P. W., 2003. Different tumors in bone each give rise to a distinct pattern of skeletal destruction, bone cancer-related pain behaviors and neurochemical changes in the central nervous system. *Int J Cancer* 104, 550-558.
- Salter, M. W., 2005. Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. *Curr Top Med Chem* 5, 557-567.
- Sanchez-Fernandez, M. A., Gallois, A., Riedl, T., Jurdic, P., Hoflack, B., 2008. Osteoclasts control osteoblast chemotaxis via PDGF-BB/PDGF receptor beta signaling. *PLoS One* 3, e3537.
- Sanders, J. L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., Butters, R. R., Brown, E. M., 2000. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 141, 4357-4364.
- Sarret, P., Beaudet, A., 2003. Neurotensin receptors in the central nervous system. *Handbook of chemical neuroanatomy Vol. 20. Peptide Receptors, Part II*. Amsterdam: Elsevier, 323-400.
- Sarret, P., Beaudet, A., Vincent, J. P., Mazella, J., 1998. Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J Comp Neurol* 394, 344-356.
- Sarret, P., Beaudet, N., Roussy, G., 2007. [NTS2 receptor: slamming the brakes on pain]. *Med Sci (Paris)* 23, 11-12.
- Sarret, P., Esdaile, M. J., Perron, A., Martinez, J., Stroh, T., Beaudet, A., 2005. Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci* 25, 8188-8196.
- Sarret, P., Gendron, L., Kilian, P., Nguyen, H. M., Gallo-Payet, N., Payet, M. D., Beaudet, A., 2002. Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 277, 36233-36243.
- Sarret, P., Krzywkowski, P., Segal, L., Nielsen, M. S., Petersen, C. M., Mazella, J., Stroh, T., Beaudet, A., 2003a. Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 461, 483-505.

- Sarret, P., Perron, A., Stroh, T., Beaudet, A., 2003b. Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 461, 520-538.
- Sawynok, J., Liu, X. J., 2004. The formalin test :Characteristics and Usefulness of the model. *Reviews in analgesia* 7, 145-163.
- Sawynok, J., Reid, A., 2001. Antinociception by tricyclic antidepressants in the rat formalin test: differential effects on different behaviours following systemic and spinal administration. *Pain* 93, 51-59.
- Schotte, A., Laduron, P. M., 1987. Different postnatal ontogeny of two [3H]neurotensin binding sites in rat brain. *Brain Res* 408, 326-328.
- Schotte, A., Leysen, J. E., Laduron, P. M., 1986. Evidence for a displaceable non-specific [3H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 333, 400-405.
- Schwei, M. J., Honore, P., Rogers, S. D., Salak-Johnson, J. L., Finke, M. P., Ramnaraine, M. L., Clohisy, D. R., Mantyh, P. W., 1999. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 19, 10886-10897.
- Sehgal, I., Powers, S., Huntley, B., Powis, G., Pittelkow, M., Maihle, N. J., 1994. Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4673-4677.
- Sethi, T., Langdon, S., Smyth, J., Rozengurt, E., 1992. Growth of small cell lung cancer cells: stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo. *Cancer Res* 52, 2737s-2742s.
- Sevcik, M. A., Luger, N. M., Mach, D. B., Sabino, M. A., Peters, C. M., Ghilardi, J. R., Schwei, M. J., Rohrich, H., De Felipe, C., Kuskowski, M. A., Mantyh, P. W., 2004. Bone cancer pain: the effects of the bisphosphonate alendronate on pain, skeletal remodeling, tumor growth and tumor necrosis. *Pain* 111, 169-180.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347-352.
- Silverman, S. M., 2009. Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner. *Pain Physician* 12, 679-684.
- Sirotnak, F. M., Otter, G. M., Schmid, F. A., 1993. Markedly improved efficacy of edatrexate compared to methotrexate in a high-dose regimen with leucovorin rescue against metastatic murine solid tumors. *Cancer Res* 53, 587-591.

Skrzydelski, D., Lhiaubet, A. M., Lebeau, A., Forgez, P., Yamada, M., Hermans, E., Rostene, W., Pelaprat, D., 2003. Differential involvement of intracellular domains of the rat NTS1 neurotensin receptor in coupling to G proteins: a molecular basis for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* 64, 421-429.

Smith, D. J., Hawranko, A. A., Monroe, P. J., Gully, D., Urban, M. O., Craig, C. R., Smith, J. P., Smith, D. L., 1997. Dose-dependent pain-facilitatory and -inhibitory actions of neurotensin are revealed by SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist: influence on the antinociceptive effect of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 899-908.

Smith, K. E., Boules, M., Williams, K., Fauq, A. H., Richelson, E., 2011. The role of NTS2 in the development of tolerance to NT69L in mouse models for hypothermia and thermal analgesia. *Behav Brain Res* 224, 344-349.

Société canadienne du cancer, Agence de la santé publique du Canada, Statistiques Canada et Registre du cancer des provinces et des territoires, *Statistiques canadiennes sur le cancer 2009*, [En ligne], http://www.cancer.ca/canada-wide/about%20cancer/cancer%20statistics/~/_media/CCS/Canada%20wide/Files%20List/liste%20de%20fichiers/pdf/stats%202009F%20Cdn%20Cancer.ashx (page consultée le 15 janvier 2012).

Solomayer, E. F., Diel, I. J., Meyberg, G. C., Gollan, C., Bastert, G., 2000. Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 59, 271-278.

Somai, S., Gompel, A., Rostene, W., Forgez, P., 2002. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 482-488.

Souaze, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A., Forgez, P., 2006. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 66, 6243-6249.

Spampinato, S., Romualdi, P., Candeletti, S., Cavicchini, E., Ferri, S., 1988. Distinguishable effects of intrathecal dynorphins, somatostatin, neurotensin and s-calcitonin on nociception and motor function in the rat. *Pain* 35, 95-104.

Spooner, M. F., Robichaud, P., Carrier, J. C., Marchand, S., 2007. Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience* 150, 675-680.

StAAF, S., Oerther, S., Lucas, G., Mattsson, J. P., Ernfors, P., 2009. Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 144, 187-199.

Strube, A., Hoffmann, J., Stepina, E., Hauff, P., Klar, U., Kakonen, S. M., 2009. Sagopilone inhibits breast cancer bone metastasis and bone destruction due to simultaneous inhibition of both tumor growth and bone resorption. *Clin Cancer Res* 15, 3751-3759.

Sugimoto, M., Kuraishi, Y., Satoh, M., Takagi, H., 1986. Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain. *Neuropharmacology* 25, 481-485.

Svensson, C. I., Medicherla, S., Malkmus, S., Jiang, Y., Ma, J. Y., Kerr, I., Brainin-Mattos, J., Powell, H. C., Luo, Z. D., Chakravarty, S., Dugar, S., Higgins, L. S., Protter, A. A., Yaksh, T. L., 2008. Role of p38 mitogen activated protein kinase in a model of osteosarcoma-induced pain. *Pharmacol Biochem Behav* 90, 664-675.

Swift, S. L., Burns, J. E., Maitland, N. J., 2010. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res* 70, 347-356.

Takahashi, T., Uehara, H., Bando, Y., Izumi, K., 2008. Soluble EP2 neutralizes prostaglandin E2-induced cell signaling and inhibits osteolytic tumor growth. *Mol Cancer Ther* 7, 2807-2816.

Tanaka, K., Masu, M., Nakanishi, S., 1990. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4, 847-854.

Teitelbaum, S. L., 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.

Tetreault, P., Dansereau, M. A., Dore-Savard, L., Beaudet, N., Sarret, P., 2011. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav* 104, 495-502.

Ting, T. P., 1952. A method for quantitative evaluation of the effects of ionizing radiations on growth of adenocarcinoma in vivo. *Science* 116, 149-151.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hole, K., 1991a. Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test. *Acta Physiol Scand* 142, 229-236.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskar, S., Rosland, J. H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.

Tjolsen, A., Lund, A., Hole, K., 1991b. Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* 193, 193-201.

Triebel, S., Blaser, J., Reinke, H., Tschesche, H., 1992. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314, 386-388.

Troen, B. R., 2003. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol* 38, 605-614.

- Tyler-McMahon, B. M., Boules, M., Richelson, E., 2000. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul Pept* 93, 125-136.
- Tyler, B. M., Groshan, K., Cusack, B., Richelson, E., 1998a. In vivo studies with low doses of levocabastine and diphenhydramine, but not pyrilamine, antagonize neurotensin-mediated antinociception. *Brain Res* 787, 78-84.
- Tyler, B. M., McCormick, D. J., Hoshall, C. V., Douglas, C. L., Jansen, K., Lacy, B. W., Cusack, B., Richelson, E., 1998b. Specific gene blockade shows that peptide nucleic acids readily enter neuronal cells in vivo. *FEBS Lett* 421, 280-284.
- Urban, M. O., Gebhart, G. F., 1997. Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 78, 1550-1562.
- Urban, M. O., Smith, D. J., 1993. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 580-586.
- Urch, C. E., Donovan-Rodriguez, T., Gordon-Williams, R., Bee, L. A., Dickenson, A. H., 2005. Efficacy of chronic morphine in a rat model of cancer-induced bone pain: behavior and in dorsal horn pathophysiology. *J Pain* 6, 837-845.
- van Beek, E. R., Lowik, C. W., van Wijngaarden, J., Ebetino, F. H., Papapoulos, S. E., 2009. Synergistic effect of bisphosphonate and docetaxel on the growth of bone metastasis in an animal model of established metastatic bone disease. *Breast Cancer Res Treat* 118, 307-313.
- Vandenbulcke, F., Nouel, D., Vincent, J. P., Mazella, J., Beaudet, A., 2000. Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci* 113 (Pt 17), 2963-2975.
- Vanegas, H., Schaible, H. G., 2004. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* 46, 295-309.
- Vincent, B., Vincent, J. P., Checler, F., 1994. Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur J Biochem* 221, 297-306.
- Vincent, J. P., 1992. Neurotensin receptors. Binding properties, transduction mechanisms, and purification. *Ann N Y Acad Sci* 668, 90-100.
- Vincent, J. P., Mazella, J., Kitabgi, P., 1999. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20, 302-309.

- Vissers, K., Hoffmann, V., Geenen, F., Biermans, R., Meert, T., 2003. Is the second phase of the formalin test useful to predict activity in chronic constriction injury models? A pharmacological comparison in different species. *Pain Pract* 3, 298-309.
- Vissers, K. C., Geenen, F., Biermans, R., Meert, T. F., 2006. Pharmacological correlation between the formalin test and the neuropathic pain behavior in different species with chronic constriction injury. *Pharmacol Biochem Behav* 84, 479-486.
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Dumont, X., Kaghad, M., Gully, D., Le Fur, G., Ferrara, P., Caput, D., 1993. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett* 317, 139-142.
- Vita, N., Oury-Donat, F., Chalon, P., Guillemot, M., Kaghad, M., Bachy, A., Thurneyssen, O., Garcia, S., Poinot-Chazel, C., Casellas, P., Keane, P., Le Fur, G., Maffrand, J. P., Soubrie, P., Caput, D., Ferrara, P., 1998. Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 360, 265-272.
- Von Korff, M., Crane, P., Lane, M., Miglioretti, D. L., Simon, G., Saunders, K., Stang, P., Brandenburg, N., Kessler, R., 2005. Chronic spinal pain and physical-mental comorbidity in the United States: results from the national comorbidity survey replication. *Pain* 113, 331-339.
- Wacnik, P. W., Eikmeier, L. J., Ruggles, T. R., Ramnaraine, M. L., Walcheck, B. K., Beitz, A. J., Wilcox, G. L., 2001. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *J Neurosci* 21, 9355-9366.
- Walker, N., Lepee-Lorgeoux, I., Fournier, J., Betancur, C., Rostene, W., Ferrara, P., Caput, D., 1998. Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 193-200.
- Watkins, L. R., Maier, S. F., Goehler, L. E., 1995. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 63, 289-302.
- Weber, K., Damron, T. A., Frassica, F. J., Sim, F. H., 2008. Malignant bone tumors. *Instr Course Lect* 57, 673-688.
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A., McCauley, L. K., 2011. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11, 411-425.
- Weiss, L., 1992. Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 10, 191-199.

Welch, D. R., Harms, J. F., Mastro, A. M., Gay, C. V., Donahue, H. J., 2003. Breast cancer metastasis to bone: evolving models and research challenges. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 3, 30-38.

Wheeler-Aceto, H., Cowan, A., 1991. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* 104, 35-44.

Wheeler-Aceto, H., Cowan, A., 1993. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. *Eur J Pharmacol* 236, 193-199.

Wheeler-Aceto, H., Porreca, F., Cowan, A., 1990. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 40, 229-238.

Yamada, M., Lombet, A., Forgez, P., Rostene, W., 1998. Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 62, PL 375-380.

Yamada, M., Watson, M. A., Richelson, E., 1993. Neurotensin stimulates cyclic AMP formation in CHO-rNTR-10 cells expressing the cloned rat neurotensin receptor. *Eur J Pharmacol* 244, 99-101.

Yamada, M., Watson, M. A., Richelson, E., 1994. Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 46, 470-476.

Yamauchi, R., Sonoda, S., Jinsmaa, Y., Yoshikawa, M., 2003. Antinociception induced by beta-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from beta-lactoglobulin, is mediated by NT(2) and D(1) receptors. *Life Sci* 73, 1917-1923.

Yanagisawa, Y., Furue, H., Kawamata, T., Uta, D., Yamamoto, J., Furuse, S., Katafuchi, T., Imoto, K., Iwamoto, Y., Yoshimura, M., 2010. Bone cancer induces a unique central sensitization through synaptic changes in a wide area of the spinal cord. *Mol Pain* 6, 38.

Yashpal, K., Coderre, T. J., 1998. Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *Eur J Pain* 2, 63-68.

Yoneda, T., Hiraga, T., 2005. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 679-687.

Yoneda, T., Sasaki, A., Mundy, G. R., 1994. Osteolytic bone metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 32, 73-84.

You, H. J., Cao, D. Y., Yuan, B., Arcndt-Nielsen, L., 2006. Sex differences in the responses of spinal wide-dynamic range neurons to subcutaneous formalin and in the

effects of different frequencies of conditioning electrical stimulation. *Neuroscience* 138, 1299-1307.

Zafeirakis, A., Zissimopoulos, A., Baziotis, N., Limouris, G. S., 2009. Management of metastatic bone pain with repeated doses of rhenium 186-HEDP in patients under therapy with zoledronic acid: a safe and additively effective practice. *Cancer Biother Radiopharm* 24, 543-550.

Zarrindast, M. R., Zarghi, A., 1992. Morphine stimulates locomotor activity by an indirect dopaminergic mechanism: possible D-1 and D-2 receptor involvement. *Gen Pharmacol* 23, 1221-1225.

Zeppetella, G., 2009. Impact and management of breakthrough pain in cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* 3, 1-6.

Zhang, X., Xu, Z. Q., Bao, L., Dagerlind, A., Hokfelt, T., 1995. Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J Neurosci* 15, 2733-2747.

Zheng, Y., Zhou, H., Modzelewski, J. R., Kalak, R., Blair, J. M., Seibel, M. J., Dunstan, C. R., 2007. Accelerated bone resorption, due to dietary calcium deficiency, promotes breast cancer tumor growth in bone. *Cancer Res* 67, 9542-9548.

Zilber, S., Epstein, N. J., Lee, S. W., Larsen, M., Ma, T., Smith, R. L., Biswal, S., Goodman, S. B., 2008. Mouse femoral intramedullary injection model: technique and microCT scan validation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 84, 286-290.

Zsurger, N., Mazella, J., Vincent, J. P., 1994. Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res* 639, 245-252.

Zwolak, P., Dudek, A. Z., Bodempudi, V. D., Nguyen, J., Hebbel, R. P., Gallus, N. J., Ericson, M. E., Goblirsch, M. J., Clohisy, D. R., 2008a. Local irradiation in combination with bevacizumab enhances radiation control of bone destruction and cancer-induced pain in a model of bone metastases. *Int J Cancer* 122, 681-688.

Zwolak, P., Jasinski, P., Terai, K., Gallus, N. J., Ericson, M. E., Clohisy, D. R., Dudek, A. Z., 2008b. Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone. *Eur J Cancer* 44, 2506-2517.

