

Université de Sherbrooke

**Évaluation comportementale et imagerie d'un nouveau modèle murin de douleur
cancéreuse osseuse et exploration du potentiel analgésique des agonistes des
récepteurs neurotensinergiques dans ce modèle**

Par
Louis Doré-Savard
Département de physiologie et biophysique

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention
du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en physiologie, Faculté de médecine et des
sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Sherbrooke, Québec, Canada
Novembre 2012

Membres du jury d'évaluation

Pr Philippe Sarret, programme de physiologie (superviseur)
Pr Alain Frigon, programme de physiologie (président)
Pr Kevin Whittingstall, programme de médecine nucléaire et radiobiologie
Pr Philippe Séguéla, département de neurologie et neurochirurgie, Université McGill



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: 978-0-494-94413-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-94413-4

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

Résumé

Une personne sur trois sera diagnostiquée d'un cancer au cours de sa vie. Malgré les progrès importants dans le développement de traitements anti-cancéreux, de nombreux défis restent à relever pour les scientifiques. Certains des cancers les plus fréquents (sein, prostate, poumon) produisent souvent des métastases osseuses lorsqu'ils atteignent un stade avancé. En plus d'être associées à un pronostic pauvre, ces métastases provoquent chez les patients des douleurs qui figurent parmi les plus difficiles à traiter. Notre étude visait à développer un modèle animal qui serait le plus représentatif possible de la réalité clinique et ce, afin d'évaluer le potentiel de nouveaux traitements anti-douleurs. Nous avons donc mis au point un modèle d'injection de cellules mammaires syngéniques dans le fémur du rat. La tumeur s'est développée sur une période de 3 semaines et sa progression a été suivie à l'aide d'une évaluation comportementale et de différentes techniques d'imagerie (μ CT, IRM et TEP). Nous avons pu détecter l'apparition de douleur à l'aide de plusieurs tests comportementaux à partir du jour 14 après l'implantation des cellules tumorales. L'imagerie par résonance magnétique nous a cependant permis de détecter l'apparition d'une tumeur dans la moelle osseuse à partir du jour 8 et la tomодensitométrie a permis de suivre la progression de la dégradation osseuse à partir de ce stade précoce. L'utilisation de divers traceurs de l'activité métabolique tumorale et osseuse en TEP a également permis d'analyser les effets du développement de la tumeur sur l'environnement osseux. Le volume de la tumeur et l'état de dégradation de l'os extraits de la prise d'image ont été corrélés aux niveaux de douleur mesurés chez les animaux. La mise en place de ces outils ouvre la voie à une évaluation améliorée du potentiel de traitements analgésiques ou anticancéreux dans ce modèle. Nous avons donc amorcé une étude portant sur la neurotensine et ses récepteurs NTS1 et NTS2. Nous avons pu observer que l'injection intrathécale de plusieurs analogues de la neurotensine a un bon potentiel analgésique dans notre modèle. Ces analogues et d'autres qui seront testés dans l'avenir pourraient représenter une avenue intéressante pouvant servir de complément aux thérapies actuelles.

Mots-clés : Douleur cancéreuse, neurotensine, imagerie par résonance magnétique, tomographie d'émission par positrons, tomодensitométrie osseuse, modèle animal, distribution pondérale dynamique, métastase osseuse.

À Joséphine et Bernadette, mes sources d'inspirations au quotidien.

I've seen people in so much pain. The little bit of pain I'm going through is nothing. They can't shut it off, and I can't shut down every time I feel a little sore.

J'ai vu tant de gens avec de la douleur. La petite douleur que je ressens n'est rien. Ils ne peuvent l'arrêter, alors je ne peux m'arrêter chaque fois que j'ai mal.

- Terry Fox

Table des matières

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Résumé français..... | II |
| Dédicace..... | III |
| Épigraphe..... | IV |
| Table des matières..... | V |
| Liste des tableaux..... | VII |
| Liste des figures..... | VIII |
| Liste des abbréviations..... | X |
| Introduction..... | 11 |
| 1. Cancer et métastases osseuses..... | 11 |
| 2. L'imagerie médical minimalement invasive..... | 17 |
| 3. Détection des métastases osseuse à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique..... | 22 |
| 4. Apport de la TEP dans la recherche sur les métastases osseuses..... | 25 |
| 5. Co-registation IRM/TEP pour une meilleure évaluation et un meilleur suivi..... | 35 |
| 6. Douleur cancéreuse : généralités..... | 36 |
| 7. Sensibilisation centrale..... | 41 |
| 8. Les modèles animaux..... | 44 |
| 9. Méthodes d'évaluation de la douleur cancéreuse..... | 46 |
| 10. Avenues thérapeutiques étudiées..... | 48 |
| 10. Neurotensine..... | 52 |
| 11. Neurotensine et douleur..... | 53 |
| 12. Neurotensine et cancer..... | 57 |
| Hypothèse et objectifs spécifiques..... | 59 |
| <i>Behavioral, imaging and histological characteristics of a new rat cancer pain model.</i> | <i>60</i> |
| <i>A micro-imaging study linking bone cancer pain to tumor growth and bone resorption in a rat model.....</i> | <i>105</i> |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Mammary Cancer Bone Metastasis Follow-up Using Multimodal Small-Animal MRI and PET Imaging..... | 140 |
| Matériel et méthodes supplémentaires..... | 174 |
| Résultats supplémentaires..... | 176 |
| Discussion..... | 181 |
| 1. Un modèle de douleur cancéreuse pour l'évaluation de nouveaux traitements analgésiques..... | 181 |
| 2. Imagerie médicale d'un modèle préclinique..... | 186 |
| 3. Une nouvelle approche comportementale pour évaluer la douleur spontanée..... | 191 |
| 4. Les analogues de la neurotensine pour le traitement de la douleur cancéreuse..... | 193 |
| 5. Le système neurotensinergique et les cancers métastatiques..... | 197 |
| 6. La neurotensine dans l'imagerie médicale diagnostique..... | 198 |
| 7. Perspectives..... | 198 |
| Conclusion..... | 201 |
| Références..... | 202 |
| Remerciements..... | 223 |

Liste des tableaux

- 1. Taux de survie sur 5 ans des principaux cancers chez les Américains de 1998 à 2008.**
- 2. Résumé des caractéristiques des différentes techniques d'imagerie utilisées en clinique pour la détection des métastases osseuses.**
- 3. Revue des études animales existantes utilisant le FDG dans un modèle de cancer osseux.**
- 4. Liste non-exhaustive des principales molécules inflammatoires impliquées dans le développement de la douleur cancéreuse osseuse.**
- 5. Expression spinale des marqueurs neurochimiques examinés dans les 3 principaux types de douleur étudiés chez le rongeur.**
- 6. Liste détaillée des modèles animaux utilisés afin de mimer la douleur cancéreuse chez l'animal.**
- 7. Principales avenues thérapeutiques étudiées à l'aide des différents modèles animaux de douleur cancéreuse.**
- 8. Structure des différents agonistes neurotensinergiques**
- 9. Liste des composés injectés en fonction de la dose et de la voie d'administration.**

Liste des figures

- 1. Les 3 théories décrivant les caractéristiques des cellules cancéreuses leur permettant de coloniser un site distant.**
- 2. Le cercle vicieux de la résorption osseuse.**
- 3. Représentation des ramifications et du caractère désorganisé de la vascularisation d'une tumeur solide.**
- 4. Métastases provenant d'un mélanome mises en évidence à l'aide du Gd-DTPA à un temps précoce suite à l'injection de l'agent de contraste.**
- 5. Comparaison entre la scintigraphie osseuse et l'IRM rehaussée chez une patiente atteinte d'un carcinome pulmonaire.**
- 6. Ostéosarcome fibroblastique récurrent visualisé au moyen de l'IRM et de la TEP au FDG.**
- 7. Gliome cérébral visualisé à l'aide de l'IRM et de la TEP au FDG ou à la méthionine.**
- 8. Visualisation des métastases osseuses chez un même patient à l'aide de la scintigraphie osseuse, du SPECT et de la TEP au NaF.**
- 9. Imagerie TEP d'un modèle de métastase osseuse issue de l'injection intra-tibiale de cellules prostatiques LAPC-9.**
- 10. Anatomie simplifiée de l'os minéralisé. Noter la dense vascularisation et l'innervation tant de l'os compact que de l'os trabéculaire.**
- 11. Mécanismes cellulaire et moléculaires de la douleur cancéreuse en périphérie**
- 12. Structure bidimensionnelle des récepteurs NTS1 et NTS2 avec mise en évidence des homologies de séquence entre les deux récepteurs.**
- 13. Effet analgésique d'une injection intrathécale de PD149163, un agoniste sélectif du récepteur NTS1, dans un modèle de douleur tonique inflammatoire et dans un modèle de douleur chronique neuropathique.**
- 14. Effet analgésique de l'agoniste sélectif NTS2 JMV-431 injecté par voie intrathécale dans un modèle de douleur aiguë et dans un modèle de douleur tonique.**
- 15. Résumé schématique de la signalisation neurotensinergique via le récepteur NTS1.**

16. Effet des substances analgésiques neurotensinergiques et de référence sur l'allodynie mécanique dans notre modèle.

17. Effets des composés analgésiques sur la distribution pondérale dynamique.

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé
ARN : Acide Ribonucléique
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BV : Bone Volume (volume d'os)
CB1/2 : Récepteur aux Cannabinoïdes type ½
CCL2 : Chemokine (C-C) ligand 2
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide
COX-2 : Cyclo-oxygénase 2
CT : Computerized Tomography (tomodensitométrie osseuse)
CXCR4 : Chemokine (C-X-C) Receptor 4
DsiRNA : Dicer-substrate small interfering RNA
FDG : Fluorodésoxyglucose
Gd-DTPA : Gadolinium- diéthylènetriaminepentacetate
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
Iba1 : Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LTP : Long-Term Potentiation (potentialisation à long terme)
MAC1 : Macrophage Antigen 1
MAP : Mitogen-Activated Protein
MCF-7 : Michigan Cancer Foundation 7 cells (cellules)
Met : Méthionine
MRMT-1 : Mammary Rat Metastatic Tumor 1
MT1-MMP : Membrane Type 1 Matrix Metalloprotease
MYC : Myelocytomatosis Oncogene
NaF : Fluorure de Sodium
NCTC2474 : Fibrosarcome NCTC clone 2472
NGF : Nerve Growth Factor (Facteur de croissance nerveux)
NMDA : N-Methyl D-Aspartate
NT : Neurotensine
NTS1 : Neurotensine Site 1
NTS2 : Neurotensine Site 2
PGE2 : Prostaglandine E2
PThRP : Parathyroid Hormone-Related Peptide
RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1
SPECT : Single Photon Emission Computerized Tomography
SUV : Standardized Uptake Values (Valeur de captage standardisée)
TEP : Tomographie d'Émission par Positrons
TGF-β : Transforming Growth Factor Beta
TrkA : Tropomyosin Receptor Kinase A
TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1
TV : Tissue Volume (volume total de tissu)

Introduction

1. Cancer et métastases osseuses

Le cancer figure parmi les fléaux du 20^e siècle qui persistent encore aujourd'hui. En 2011, 1 638 910 nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en Amérique du Nord (Siegel, Naishadham, and Jemal 2012). Il est prévu que près de 600 000 Nord-Américains décèderont de la maladie en 2012. La recherche biomédicale a amené des progrès vertigineux dans les connaissances sur cette maladie, tant au niveau des mécanismes moléculaires et cellulaires qu'au niveau de l'efficacité des méthodes de détection, de suivi et de traitement. Cela a permis un bond important dans le taux de survie à un cancer sur 5 ans. En effet, une femme atteinte d'un cancer du sein dans les années 70 avait 3 chances sur 4 d'y survivre 5 ans après le diagnostic. Aujourd'hui, les chances de survie d'une patiente atteinte du même cancer sont plutôt de 9 sur 10 (Siegel et al. 2012). Une telle amélioration est attribuable autant à des progrès dans la précocité de la détection qu'au développement de meilleurs traitements. Il est à noter que les minorités ethniques en Amérique du Nord sont toutes plus susceptibles de recevoir un diagnostic de cancer et que le taux de survie sur 5 ans est significativement plus bas, particulièrement chez les hommes (Siegel et al. 2012). Il est présumé que l'accessibilité aux soins de santé est le principal facteur en cause pour expliquer ces différences dans le taux de survie des patients des minorités ethniques.

Le taux de survie sur 5 ans est une statistique qui varie énormément en fonction du stade du cancer au moment du diagnostic. En effet, les chances du patient sont maximales lorsque le cancer est confiné à son site primaire. À titre d'exemple, le tableau 1 présente les taux de survie des 4 cancers les plus fréquents en Amérique du Nord selon le stade d'avancement.

| Type de cancer (Incidence / 100 000 habitants) | Tous les sites | Local | Régional | Distant |
|---------------------------------------------------|----------------|-------|----------|---------|
| Sein (23.5; femmes seul.) | 89% | 99% | 84% | 23% |
| Prostate (24.4; hommes seul.) | 99% | 100% | 100% | 29% |
| Colon et rectum (17.6) | 64% | 90% | 69% | 12% |
| Poumons et bronches (53.7) | 16% | 52% | 24% | 4% |

Tableau 1. Taux de survie sur 5 ans des principaux cancers chez les Américains de 1998 à 2008. Adapté de (Siegel, Naishadham, and Jemal 2012).

Ce que l'on remarque à la lecture de ce tableau, c'est que le développement de métastases distantes, de tumeurs dans un site secondaire éloigné du site primaire, est une étape qui correspond à une aggravation significative de la maladie. Certains types de tumeur ont tendance à former des métastases beaucoup plus que d'autres. Ainsi, les mélanomes et les cancer du pancréas sont souvent hautement métastatiques alors que le glioblastome multiforme, bien que localement très invasif, n'est que rarement disséminé à d'autres endroits dans le corps.

Le potentiel métastatique d'une tumeur est influencé par plusieurs facteurs. Les différentes théories menant au développement de métastases suite à une croissance tumorale à un site primaire sont énumérées dans la figure 1. Brièvement, la théorie la plus largement acceptée propose qu'un nombre très limité de cellules au sein d'une tumeur soit capable d'effectuer tout le processus menant à la formation d'une métastase (Eccles and Welch 2007). Ces quelques cellules aux caractéristiques particulières sont les seules à pouvoir entrer dans la circulation sanguine ou lymphatique et sont aussi aptes à s'implanter dans un site distant leur étant favorable. On pense aussi que certaines tumeurs expriment plus fortement l'ensemble des facteurs génétiques permettant la production de métastases. Ces tumeurs seraient donc en mesure de coloniser un site distant alors que d'autres tumeurs seraient moins enclines à le faire en absence de ce patron d'expression. Finalement, il semblerait que les caractéristiques génétiques de l'hôte ne sont pas étrangères à la probabilité de développer des métastases. En effet, un hôte plus permissif serait prédisposé alors qu'un hôte exprimant de façon adéquate un certain nombre de gènes serait en quelque sorte protégé contre la dissémination de la tumeur (Eccles and Welch 2007). Il est

important de noter que les experts ont tendance à faire un amalgame de ces théories afin d'expliquer la réalité et que ces trois modèles pourraient être hybridés pour en former un autre plus complet.

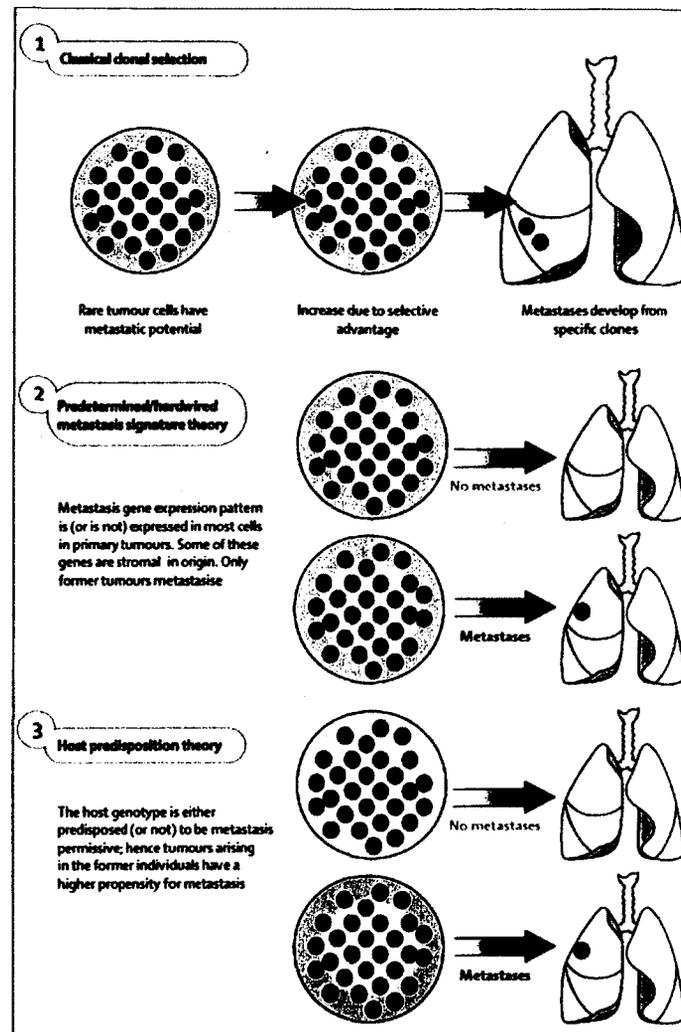


Figure 1. Les 3 théories décrivant les caractéristiques des cellules cancéreuses leur permettant de coloniser un site distant. Extrait de (Eccles and Welch 2007).

Les tumeurs mammaires figurent parmi les types de cancer qui peuvent avoir un phénotype très agressif avec dissémination métastatique. Mais l'organe cible de la cellule cancéreuse en migration ne sera pas le même selon la tumeur d'origine. En effet, il y a certains tissus qui sont plus favorables pour des types de tumeurs en particulier (Paget 1889). Par exemple, le cancer colorectal présente le plus souvent des métastases au foie. Le mélanome s'implante plus souvent dans le poumon alors que les cancers mammaires et prostatiques ont une propension pour les os longs et les vertèbres (Fidler 2003).

Les métastases osseuses sont le problème lié au cancer ayant le plus d'impact sur la qualité de vie des patients (Gnant et al. 2012). En effet, les tumeurs osseuses sont la principale source de douleur chez les patients en stade avancé (Mercadante 1997). Des douleurs liées au traitement ou encore à une tumeur viscérale peuvent survenir, mais en plus faible proportion. Lorsqu'une cellule s'échappe de la tumeur primaire, elle passe dans la circulation sanguine ou lymphatique et est transportée dans le corps de manière aléatoire. Ensuite la théorie de la graine et du sol (traduction libre de Seed and Soil) entre en ligne de compte (Fidler 2003). En résumé, la cellule cancéreuse s'implantera où le « sol » est fertile pour elle, où le microenvironnement est propice à l'adhésion et à la prolifération des cellules cancéreuses. Dans le cas des cancers du sein, de la prostate, du poumon et de la thyroïde, l'os est un microenvironnement adéquat à la formation de métastases. En effet, des études basées sur l'autopsie de patients décédés du cancer montre que 60-70% d'entre eux avaient des métastases osseuses lorsqu'ils étaient atteints d'un cancer du sein ou de la prostate (Coleman 1997).

Plusieurs des mécanismes moléculaires qui favorisent l'adhésion des cellules tumorales dans l'os ont été élucidés. Un des acteurs primordiaux dans ce phénomène est le couple SDF1/CXCR4 (Furusato et al. 2010). La chimiokine SDF1 est présente en forte concentration dans les tissus propices aux métastases alors que le récepteur CXCR4 est exprimé par un très grand nombre de cellules au potentiel métastatique. Plusieurs molécules d'adhésion de la famille des intégrines font également la promotion de l'invasion des cellules cancéreuses dans l'os. Des études animales où la fonction de ces protéines est bloquée ont démontré l'importance de ces facteurs dans l'implantation et l'adhésion des métastases osseuses (Hirbe et al., 2010).

Une fois la tumeur installée dans l'os, un sorte de boucle d'autoactivation assure alors la croissance de la tumeur (Roodman 2004). C'est dans ce cercle vicieux propre aux métastases osseuses possédant un caractère lytique que la majorité des espoirs sont mis pour la recherche de traitement (Figure 2).

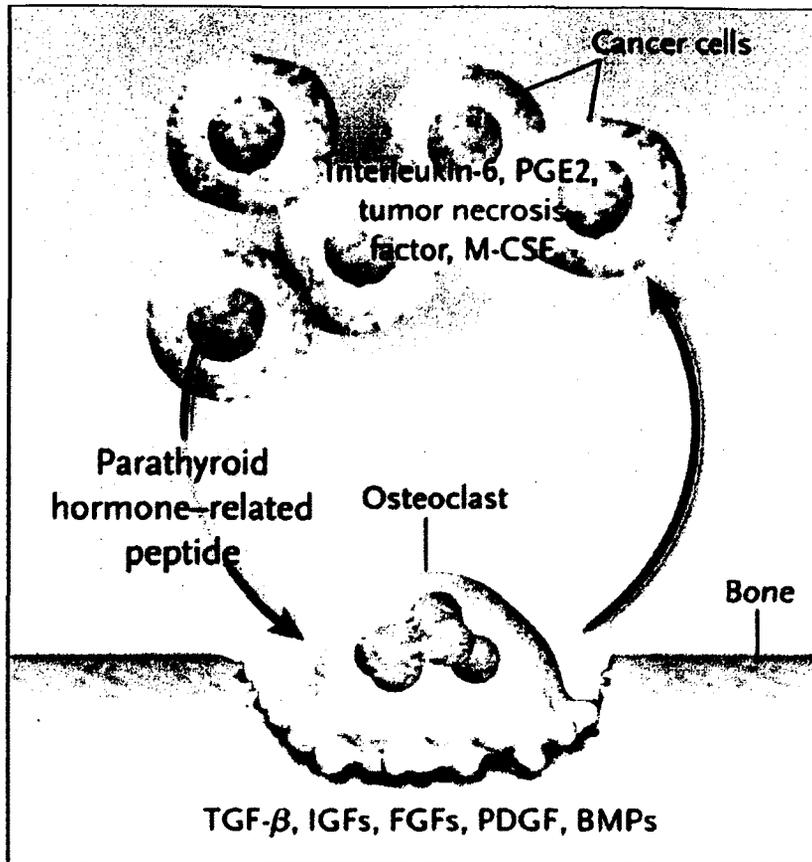


Figure 2. Le cercle vicieux de la résorption osseuse. Extrait de (Roodman 2004).

Les cellules de carcinome mammaire stimulent le microenvironnement osseux de plusieurs façons. D'abord, les cellules sécrètent des molécules qui stimulent l'ostéoclastogénèse telles que le peptide lié à l'hormone parathyroïde (PTHrP), l'interleukine 6, la prostaglandine E2 et plusieurs autres. Ces molécules agissent sur les ostéoclastes, ces grosses cellules multinucléées responsables de la résorption osseuse, via la production du ligand au récepteur associé à NFκB (RANKL). Cette dernière cytokine agit directement sur les ostéoclastes afin de favoriser leur prolifération, leur différenciation et leur activité. La matrice osseuse est ensuite résorbée (détruite) au niveau de l'interface entre l'os minéralisé et la surface en brosse de la cellule. Ce processus de résorption libère dans l'environnement une série de facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse. Parmi eux, on note TGF-β, qui attire l'attention en ce moment en raison de ses effets sur le cancer, la résorption osseuse et même la douleur (Z. Zhang et al. 2012; Z. Hu et al. 2012; Biswas et al. 2011; Lantero et al. 2012). Ces facteurs de croissance viennent augmenter l'activité invasive et proliférative de

la tumeur et la pousse à sécréter encore plus d'agents activateurs de l'ostéoclastogénèse. La plupart des médicaments sur le marché et à l'étude dans le domaine des métastases osseuses visent à interrompre cette boucle d'autoactivation. Ainsi, le fait de bloquer spécifiquement le processus de résorption osseuse, sans agir sur les cellules tumorales, peut quand même réduire de façon importante la croissance de la tumeur. Par exemple, l'administration d'un bisphosphonate visant à inhiber les ostéoclastes a montré à plusieurs reprises des effets de ralentissement dans le développement du cancer (Coleman 2007b). Cependant, certains effets des bisphosphonates de dernière génération sur les cellules cancéreuses ont été avancés récemment (Lyseng-Williamson 2008; Rachner et al. 2010; Ottewell et al. 2009; Ottewell et al. 2008; Dass and Choong 2007). Parmi les effets potentiels des bisphosphonates sur l'activité tumorale, on note une diminution de l'adhésion, de l'invasivité et de la migration des cellules. De plus, l'angiogenèse et la prolifération des cellules semblent aussi pouvoir être affectées par ce type de traitement. Bref, les médicaments visant l'inhibition de la résorption osseuse exercent un effet indirect sur la progression de la métastase en limitant sa capacité à prendre de l'expansion dans l'os et à se nourrir de son environnement. Par contre, de nombreuses études à venir tenteront de confirmer les effets potentiellement directs de ces drogues sur la tumeur.

Le principal facteur permettant de faciliter le traitement des métastases osseuses est la capacité que nous avons à en faire la détection à un stade précoce. En effet, cette étape est cruciale car le stade auquel le cancer est détecté influencera grandement le pronostic et la prise de décision par rapport au traitement à administrer. Pour ce faire, on peut avoir recours à plusieurs techniques différentes. Une méthode fréquente consiste à faire la détection de facteurs sanguins laissant présager un niveau élevé de métabolisme osseux (Coleman et al. 2008). Il est donc possible de détecter avec précision des niveaux augmentés de marqueurs de formation osseuse (ostéocalcine, alcaline phosphatase, fragment du procollagène de type 1) ou encore de résorption osseuse (pyridinoline, métabolites du collagène de type 1, sialoprotéine, RANKL, etc.) (Coleman et al. 2008). L'avantage de ces marqueurs est qu'ils permettent de détecter des changements aigus dans le métabolisme osseux. À l'inverse, d'autres méthodes de détection peu invasives telles que la mesure de la densité osseuse, la radiographie standard et la scintigraphie, ne permettent

que de visualiser la résultante des changements dans l'homéostasie osseuse. Cependant, les marqueurs sanguins ont plusieurs limitations qui peuvent rendre leur mesure imprécise. D'abord, les concentrations de ces marqueurs varient beaucoup en fonction de l'heure de la journée (de 10 à 20% entre le maximum à minuit et le minimum enregistré à midi) (Coleman et al. 2008). Ils varient également à l'intérieur d'une année, avec une concentration maximale pendant la période d'été. Finalement, les taux de ces marqueurs sont influencés par le sexe et l'âge du patient. La ménopause affecte les concentrations en raison de l'ostéoporose chez les femmes (Brown et al. 2009). Le coefficient de variation associé aux méthodes de détection n'est pas non plus à négliger (Coleman et al. 2008). C'est pour ces raisons que malgré les coûts élevés et la disponibilité parfois limitée, l'imagerie médicale avancée constitue encore l'avenue la plus empruntée pour la détection, la gradation et le suivi de traitement pour les métastases osseuses.

2. L'imagerie médicale minimalement invasive

Le squelette étant le troisième organe le plus fréquemment touché par les métastases (après les poumons et le foie), des techniques de détection ont été développées afin d'en faire un diagnostic le plus précoce possible. La scintigraphie osseuse s'est rapidement imposée comme une technique de routine pour la visualisation des métastases osseuses (Histed et al. 2012). Cette technique utilise comme traceur un diphosphonate marqué au technétium-99. Ce composé radioactif a une affinité importante pour la matrice osseuse en formation. Sa sensibilité relativement élevée et son faible coût en ont fait la technique de choix dans la détection de métastases osseuses (Costelloe et al. 2009). En effet, plusieurs études attestent d'une sensibilité supérieure à 90% se comparant avantageusement aux techniques les plus modernes (Moser 1990). Par contre le principal désavantage de la scintigraphie est sa relativement faible spécificité. En effet, la matrice osseuse en formation est présente dans de nombreuses conditions plus bénignes telles que l'arthrite rhumatoïde inflammatoire, l'ostéomyélite, les fractures et même l'ostéoporose et les blessures sportives. Par conséquent, des faux positifs sont fréquemment rapportés (Houssami and Costelloe 2012). Cela a poussé la communauté médicale et scientifique à remettre en question la nécessité de ce test qui, de toute façon, requiert souvent d'autres étapes dans

l'établissement d'un diagnostic afin de confirmer les observations en scintigraphie (biopsie, autre technique d'imagerie, etc.) (Jacobson and Fogelman 1998). À la fin des années 90 et au début des années 2000, les études comparatives se sont mises à fuser de toute part afin d'évaluer la pertinence de ce test, surtout à la suite de progrès significatifs dans le développement de nouvelles techniques d'imagerie telles que la tomодensitométrie assistée par ordinateur (CT), la tomographie d'émission par positrons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

| | | | | | |
|---------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BS | Faible coût | Suivi de traitement allongé (6-8 mois) | 64%-77% | ≈ 80% | Technique la plus répandue et la plus accessible mais moins performante dans la détection et le suivi. |
| SPECT | Augmente la sensibilité de la BS | Aucun support anatomique | ≈ 80%-90% | ≈ 90-95% | Bon complément à la BS pour la rendre plus performante. |
| TDM | Information anatomique détaillée | Difficulté à détecter certains types de tumeur en particulier. | ≈75% | ≈95% | Modalité anatomique répandue et performante pour les tumeurs osseuses et abdominale. Spécificité élevée mais faux-négatifs fréquents. |
| IRM | Information anatomique détaillée. Sensibilité +++. | Information fonctionnelle limitée. | 90% | 92-95% | Information anatomique de qualité. Utile pour le suivi de traitement. Particulièrement performante pour certains types de tumeurs compliqués (colonne vertébrale, moelle osseuse...) |
| TEP | Information métabolique. Sensibilité +++. | Aucun support anatomique. Coût élevé. Disponibilité encore limitée | 90-99% | 92-97% | Modalité de choix pour la détection, la stadification et le pronostic. L'amélioration de la disponibilité la rendra encore plus répandue. |
| TEP/TDM | Information métabolique + anatomique | Coût et disponibilité | 90-95% | 90-95% | Le couplage TEP/CT permet une information plus complète et un meilleur suivi. |

Tableau 2. Résumé des caractéristiques des différentes techniques d'imagerie utilisées en clinique pour la détection des métastases osseuses. BS: scintigraphie osseuse, SPECT: tomographie d'émission monophotonique, TDM : tomodensitométrie. L'information est extraite de (Cook 2010; L.-M. Wu et al. 2011; Sandu et al. 2011; Vassiliou et al. 2011; L.-M. Wu et al. 2012; Yang et al. 2011).

La CT a récemment remplacé la radiographie conventionnelle pour la détection de métastases en raison de sa plus grande sensibilité et sa reproductibilité, en particulier pour les tumeurs au foie et aux poumons (Bristow et al. 2008). Cette modalité produit des

images à très haute résolution de l'organe squelettique, ce qui la rend supérieure à la scintigraphie osseuse à bien des égards. Cependant, la dose de radioactivité requise a été mise en cause récemment dans l'augmentation de la dose de radiation moyenne reçue par la population générale (Park 2012). Malgré tout, son utilisation ne cesse d'augmenter, surtout en raison de son couplage à la TEP. Ce tandem TEP/TDM figure parmi les modalités les plus sensibles et les plus spécifiques disponibles (L.-M. Wu et al. 2012; Yang et al. 2011). De plus, il s'agit d'une technique très sensible aux effets d'un traitement. Ainsi, il est possible d'observer des changements anatomiques suite à un traitement 3 mois après le début de ce dernier à l'aide du CT, ce qui est comparable à l'IRM (Vassiliou et al. 2011). Ce délai dans la visualisation des effets du traitement peut être raccourci davantage en couplant la CT avec la TEP (1 mois) (Vassiliou et al. 2011).

L'imagerie par résonance magnétique a été rapportée pour la première fois dans les années 50 par Hermann Carr de l'Université Rutgers. Le développement de la technique s'est poursuivi dans les années 70 alors qu'il a été suggéré pour la première fois que l'IRM pourrait servir à diagnostiquer le cancer puisqu'une tumeur présentait un aspect différent des tissus sains. Les premières images extraites d'un patient humain ont été publiées en 1977. Depuis ce temps, l'IRM est devenue une technique parmi les plus perfectionnées pour obtenir des images détaillées de l'anatomie humaine. Le diagnostic de tous les types de cancers, particulièrement les métastases de la moelle osseuse de la colonne vertébrale et des os longs, a été porté à un niveau supérieur grâce à cette technique (L.-M. Wu et al. 2011).

L'IRM procure des images des tissus mous chargés en eau (et donc en protons mobiles). L'intensité du signal est donc une indication de la quantité d'eau contenue dans un tissu. L'interprétation des résultats repose surtout sur le niveau d'intensité du signal correspondant à l'état du tissu (Parmar 2010). C'est la première différence qu'il peut y avoir entre une tumeur et son macro-environnement sain. En absence d'un agent de contraste, des images pondérées T1 vont montrer un os cortical très noir puisqu'il ne contient pratiquement aucun proton mobile (Parmar 2010). La moelle osseuse aura une couleur grise, tout comme une tumeur osseuse d'ailleurs. Cela fait en sorte que la tumeur et

la moelle osseuse saine sont difficile à distinguer sur des images pondérées T1. Par contre, la visualisation de la tumeur peut être améliorée grâce à l'utilisation d'un agent de contraste (e.g. le gadolinium-diéthylènetriaminepentacetate (Gd-DTPA)) qui change les propriétés magnétiques des protons qui l'entourent, ce qui a pour effet d'augmenter de façon importante l'intensité des tissus qui accumulent plus d'agent de contraste. Ce dernier est injecté chez le patient ou l'animal par voie intraveineuse et se distribue dans le corps en fonction de la vascularisation et de la perfusion de chaque tissu. Une tumeur en pleine croissance doit activer le processus d'angiogenèse qui lui permettra de survivre. En effet, chaque nouvelle cellule tumorale doit se trouver au plus à 2 mm du capillaire le plus proche afin d'être approvisionnée en oxygène. La tumeur crée donc son réseau vasculaire propre. Ces vaisseaux sanguins sont différents des artérioles et des veinules normales; ils sont irréguliers, tortueux, fragiles et hautement perméables (Türkbey et al. 2010)(Figure 3).



Figure 3. Représentation des ramifications et du caractère désorganisé de la vascularisation d'une tumeur solide (Extrait de (Türkbey et al. 2010)).

Étant donné que la tumeur osseuse sera perfusée à l'aide de ces vaisseaux désorganisés, l'agent de contraste sera distribué dans la tumeur selon des paramètres très différents des tissus sains environnants. La perméabilité des vaisseaux favorisera un échange plus rapide de l'agent de contraste entre le plasma et le tissu. De plus, le traceur va s'accumuler dans le

tissu en demeurant trappé dans le liquide interstitiel de la tumeur. Le résultat sera une augmentation importante de l'intensité du signal dans la tumeur (figure 4).

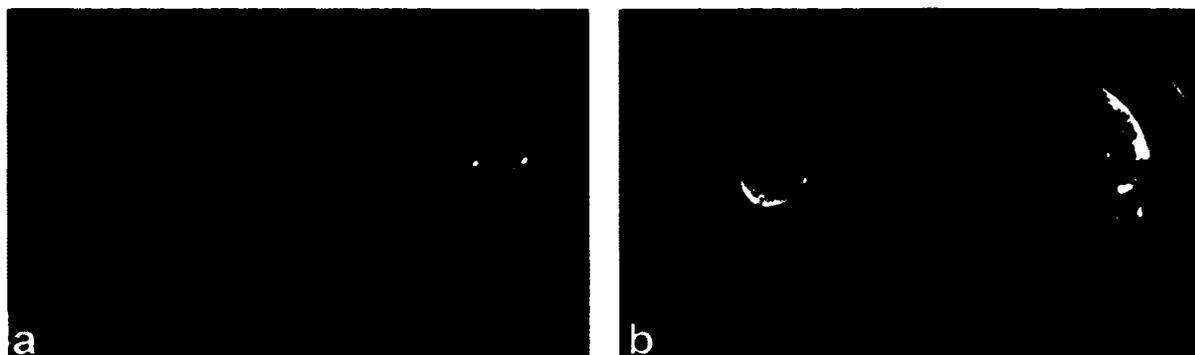


Figure 4. Métastase spinale (montrée par une flèche) provenant d'un mélanome mise en évidence à l'aide du Gd-DTPA à différents temps suivant l'injection de l'agent de contraste. A) – phase artérielle (précoce). (B) – phase interstitielle (tardive). Extrait de (Northam et al. 2011).

3. Détection des métastases osseuse à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est la technique la plus efficace pour détecter les lésions de la moelle osseuse. En effet, il a été démontré que la radiographie, la scintigraphie et la tomodensitométrie n'avaient pas la sensibilité nécessaire pour la détection précoce d'une métastase osseuse avant la modification de l'homéostasie de l'os (Moynagh et al. 2010). En effet, une invasion de la moelle ne produira pas immédiatement des changements détectables à l'aide de la scintigraphie. Plusieurs études comparatives ont bien démontré la supériorité de l'IRM par rapport aux techniques d'imagerie dites conventionnelles (Voir Tableau 1). En fait, la sensibilité de l'IRM atteint parfois 100% au sein d'un groupe de patients cancéreux. À titre d'exemple, une étude menée sur 115 patients a montré que 30% des scintigraphies des patients sur lesquels une métastase osseuse avait été détectée à l'IRM ressortaient négatives (Ghanem et al. 2006). Une autre étude menée chez des patients atteints d'un cancer avancé du poumon arrivait à la conclusion que 10 des 24 patients examinés à l'aide d'une scintigraphie avait un niveau d'avancement de la maladie plus faible qu'en réalité. Ces mêmes patients ont été déclarés en stade « très avancé » à l'aide de l'IRM (Avrahami et al. 1989). Seulement 70% des lésions détectées à l'IRM l'ont été par la scintigraphie (Haubold-Reuter et al. 1993). Il a été observé que l'IRM était particulièrement efficace au

niveau de la colonne vertébrale. En effet, les lésions des vertèbres sont souvent ignorées à la scintigraphie alors qu'elles sont très évidentes à l'IRM (Figure 5).

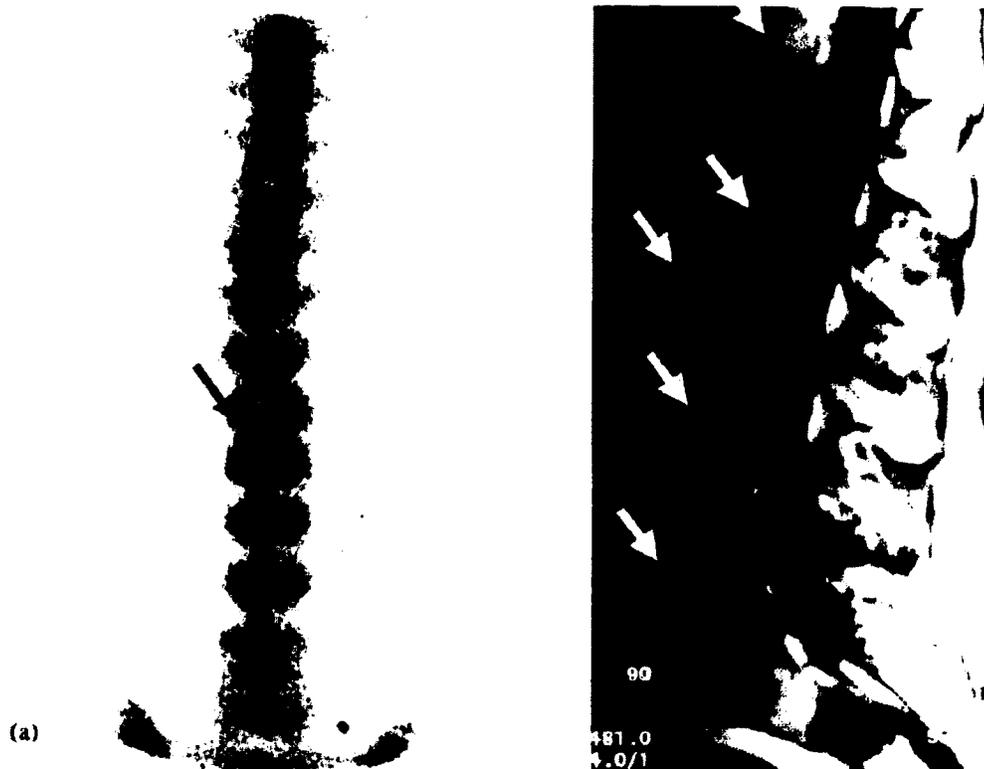


Figure 5. Comparaison entre la scintigraphie osseuse (gauche) et l'IRM rehaussée (droite) chez une patiente atteinte d'un carcinome pulmonaire. La scintigraphie détecte une seule tumeur alors que l'IRM montre plutôt une affection généralisée de toute la colonne vertébrale lombaire. Extrait de (Ghanem et al. 2005).

De la même manière, l'IRM a démontré plus de sensibilité que le CT dans la détection des tumeurs de la moelle osseuse (Müller-Horvat et al. 2006). Ces différences dans les capacités de diagnostic des techniques d'imagerie peuvent modifier significativement la stratégie de traitement. L'étude de Muller-Horvat a conclu que l'IRM avait entraîné une modification de la stratégie de traitement qui avait été élaborée suite à l'interprétation du CT. Ces modifications étaient surtout en lien avec l'évaluation de l'avancement de la maladie. Sur une cohorte de 43 patients souffrant d'un mélanome métastatique avancé, le CT a détecté un total de 522 métastases contre 730 pour l'IRM. La principale différence réside dans le fait que le CT a détecté seulement 23 des 132 métastases de la moelle osseuse identifiées à l'IRM. Le traitement a été modifié dans 10 de ces patients suite à l'interprétation de l'IRM (24%). Une équipe française a réalisé le même type d'étude auprès de 40 patients et a modifié sa décision quant au traitement dans 10% des cas (Dellestable et al. 2011). Une

étude de Hausmann et collègues s'est particulièrement intéressée à la spécificité des techniques. Les auteurs ont observé d'importantes différences à ce niveau entre l'IRM (83,4% de spécificité) et la tomodensitométrie (50,4%) (Hausmann et al. 2011).

L'IRM a aussi servi de technique de détection, de suivi de croissance et d'évaluation de traitement dans plusieurs modèles animaux de cancer des os. Dans un modèle de cancer de la prostate chez la souris, le volume de la tumeur osseuse implantée dans le fémur a été corrélé au niveau d'antigène prostatique spécifique et aux observations histologique post-mortem. Les auteurs ont alors conclu que l'IRM représentait un bon traceur de l'efficacité du traitement (Kundra et al. 2007). Cette corrélation avec les paramètres histologiques a aussi été observée chez le rat (Murakami et al. 2008). L'IRM a aussi été en mesure de mesurer les variations de volume d'un sarcome d'Ewing osseux induit chez la souris suite à l'administration de l'agent alkylant Treosulfan. La mesure expérimentale du volume de la métastase est un paramètre fréquemment utilisé pour vérifier l'efficacité d'un traitement. Le groupe de Rozel a pu ainsi démontrer l'efficacité d'un traitement chimiothérapique combiné à un anticorps anti-CCL2 dans un modèle de souris à injection intra-cardiaque de cellules de carcinome mammaire PC3 (Rozel et al. 2009). Il est aussi possible d'extraire des paramètres plus fins des images obtenues ayant rapport, par exemple, à la vascularisation de la tumeur afin d'évaluer un traitement visant l'angiogenèse (Siegel, Naishadham, and Jemal 2012; Bäuerle et al. 2008; Bäuerle et al. 2010). En plus d'une évaluation de la réponse au traitement, des études descriptives très poussées utilisant l'IRM peuvent améliorer nos connaissances sur la microstructure des métastases osseuses (Siegel et al. 2012; Budde et al. 2012). Le nombre d'étude utilisant l'IRM comme méthode de suivi du traitement continue d'augmenter dans les études précliniques. Avec l'amélioration des technologies disponibles (aimants plus puissants, modalités d'analyse, etc.), cette tendance devrait se maintenir au cours de la prochaine décennie. Les groupes de recherches qui sont bien positionnés dans le domaine de l'imagerie du cancer se trouveront sans doute à l'avant-plan des prochaines découvertes importantes dans le traitement de cette maladie.

4. Apport de la TEP dans la recherche sur les métastases osseuses

La tomographie d'émission par positrons (TEP) a d'abord été considérée comme une procédure de recherche. Récemment, l'utilisation de la TEP est passée à un autre niveau et les applications cliniques en oncologie sont maintenant parmi les plus importantes dans la détection des cancers. La technique repose sur la détection d'un rayon gamma émis par un traceur radioactif émetteur de positrons. Ce traceur est administré dans le corps du patient ou de l'animal par voie intraveineuse et sera distribué dans le corps selon ses propriétés. Les images tomographiques produites par la TEP possèdent une haute résolution et un seuil de détection très faible. Cela permet une sensibilité et une spécificité supérieures à la majorité des techniques d'imagerie conventionnelles (Siegel, Naishadham, and Jemal 2012; Langsteger, Heinisch, and Fogelman 2006). L'information fournie par la TEP est d'abord fonctionnelle. La nature et les propriétés du traceur ainsi que la façon dont il va se distribuer dans l'organisme fournissent des renseignements sur l'état fonctionnel du tissu d'intérêt. Malgré qu'il soit possible de tirer une certaine quantité d'information anatomique des images obtenues, la TEP est le plus souvent combinée à une technique d'imagerie permettant une visualisation plus détaillée du tissu (Pichler et al. 2008). Le plus souvent, il s'agit de la tomодensitométrie (CT) ou de l'IRM.

Le traceur le plus fréquemment utilisé, autant en clinique qu'en pré-clinique, est sans contredit le fluoro-désoxyglucose marqué au fluor-18 (18F-FDG). Cet analogue du glucose est naturellement capté par les tissus ayant une activité métabolique élevée tels que le cerveau, les reins et surtout les cellules cancéreuses (Figure 6). Une fois à l'intérieure de la cellule, le FDG est phosphorylé en FDG-6-phosphate, une molécule qui demeure longtemps dans la cellule sans être métabolisée. L'imagerie TEP au FDG est maintenant très répandue en raison de son coût relativement faible, sa grande sensibilité et de sa spécificité. Son utilisation va maintenant de la détection précoce au suivi du traitement, en passant par la stadification de la maladie. Par contre, il ne faut pas négliger le fait que certaines conditions bénignes (tumeur bénigne, inflammation) provoquent une augmentation du captage de FDG dans le tissu. Cela peut entraîner des faux positifs, dans une plus faible proportion que la scintigraphie (Eccles and Welch 2007; Peterson 2007).

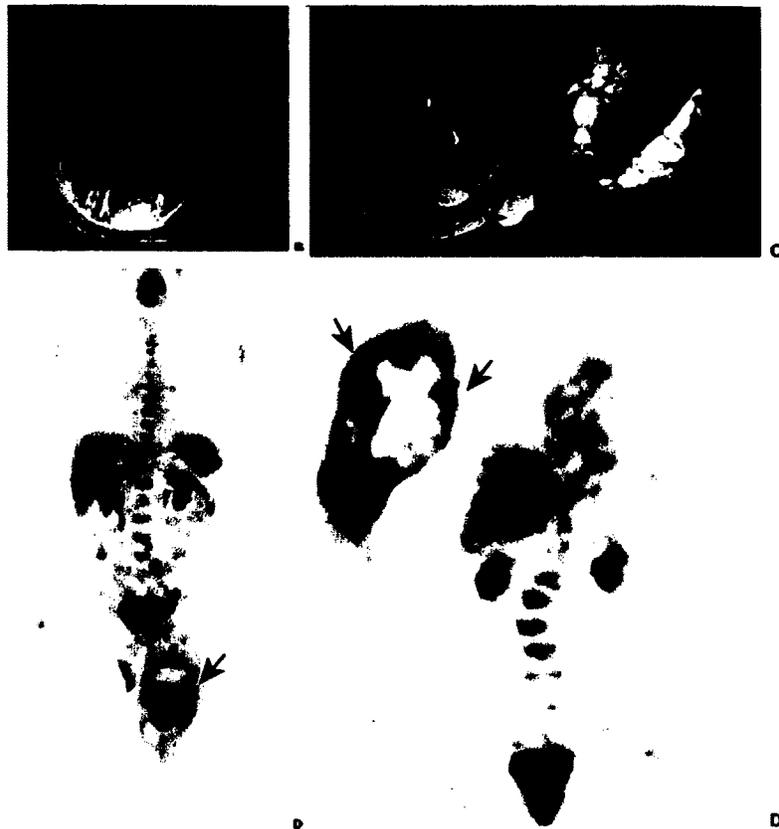


Figure 6. Ostéosarcome fibroblastique récurrent visualisé au moyen de l'IRM (haut) et de la TEP au FDG (bas). Une forte activité métabolique est détectée au niveau du fémur du premier patient (flèches rouges) et de l'humérus du second (flèches bleues). Par contre, dans les deux cas, aucun site distant ne semble contenir de tumeur. Extrait de (Eccles and Welch 2007; Peterson 2007)

Malgré son utilisation répandue en clinique, la TEP utilisant le FDG comme traceur est une modalité relativement nouvelle dans le domaine du cancer des os au niveau préclinique. Au moment d'écrire ces lignes, seulement sept études portant sur des tumeurs osseuses utilisant le FDG chez des rongeurs ont pu être répertoriées (Tableau 3).

| Source cellulaire | Modèle animal/Animaux de laboratoire | Objectifs de l'étude | Publications |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Mélanome B16 syngénique | Souris C57BL/6. Modèle systémique (voie i.v.) | Possibilité de détecter de petites métastases vs CT | (Eccles and Welch 2007; Winkelmann et al. 2006) |
| Prostatiques humaines (PC-3, LAPC9, C42B) | Souris SCID mâles. Injection intra-tibiale. | Caractérisation du captage en fonction des propriétés des cellules (lytique vs blastique). | (Paget 1889; Hsu et al. 2008) |
| Prostatiques humaines (PC-3) | Souris SCID mâles. Injection intra-tibiale. | Évaluation d'un traitement RANKL/BMP | (Fidler 2003; Virk et al. 2009) |
| Ostéosarcome syngénique (1325) | Souris FVB. Modèle systémique (voie s.c.) | Évaluation d'un traitement facteur oncogénique MYC | (Gnant et al. 2012; Arvanitis et al. 2008) |
| Ostéosarcome syngénique (1547) | Rats Sprague-Dawley mâles juvéniles (25 jrs). Modèle orthotopique. | Correlation SUVmax vs réponse à la chimiothérapie | (Mercadante 1997; Dutour et al. 2009) |
| Mammaires humaines (MDA-MB-231) | Rats immunodéficients. Modèle systémique (voie i.a.) | Évaluation d'un traitement contre les intégrines (dim. adhésion) | (Fidler 2003; Cheng et al. 2011) |
| Mammaires humaines (MDA-MB-231) | Rats athymiques femelles. Injection intravertébrale (L5) | Caractérisation du modèle dans le temps | (Coleman 1997; Liang et al. 2011) |

Tableau 3. Revue des études animales existantes utilisant le FDG dans un modèle de cancer osseux.

L'évaluation de traitements anti-cancéreux est probablement l'application la plus prometteuse de cette technique. Le groupe de Virk a évalué la capacité d'un inhibiteur de RANKL couplé à une approche d'inactivation génique pour la Bone Morphogenetic Protein (BMP) à réduire la résorption osseuse et la croissance tumorale dans un cancer prostatique

lytique (Furusato et al. 2010; Virk et al. 2009). La taille de la tumeur métaboliquement active a été évaluée de façon qualitative à l'aide du FDG. Il a été constaté que le traitement combiné réduisait la taille de la tumeur de façon plus importante que l'un ou l'autre des traitements séparés. Toujours chez la souris, une étude américaine a cherché à montrer le rôle du facteur oncogénique MYC à l'aide de l'imagerie au FDG (Roodman 2004; Arvanitis et al. 2008). Malgré que les souris invalidées pour ce récepteur aient présenté un nombre significativement réduit de tumeurs, le FDG n'a pas permis d'établir des différences au niveau de l'activité métabolique des tumeurs par rapport aux tumeurs des souris de type sauvage. Il est aussi possible de corréliser la réponse au traitement de façon quantitative à l'aide du captage maximal de la tumeur (SUVmax). De telles études ont été réalisées dans des modèles d'ostéosarcome orthotopique et de métastases osseuses induites par des cellules mammaires chez le rat (Roodman 2004; Dutour et al. 2009; Cheng et al. 2011). Le FDG demeure donc le traceur de choix en oncologie. Par contre, son utilisation risque d'être encore augmentée afin d'évaluer différentes avenues de traitement dans des modèles pré-cliniques. Une telle validation viendra bonifier de manière importante le transfert des connaissances des modèles animaux vers la clinique.

L'activité glycolitique n'est pas le seul indicateur de l'activité métabolique d'une tumeur. En effet, le métabolisme protéique peut aussi servir d'indicateur d'un processus tumoral dans un tissu. Les acides aminés (AA) sont des nutriments essentiels à la synthèse de protéines. Ils sont acheminés aux tissus en fonction des besoins. Les AA circulants sont dirigés à l'intérieur de la cellule à l'aide de transporteurs complexes non spécifiques (qui peuvent transporter plusieurs AA différents). De la même manière, un acide aminé peut être transporté par plusieurs types de transporteurs différents. La méthionine, un acide aminé sulfuré neutre est habituellement (mais pas exclusivement) pris en charge par un système de transport appelé système L. Ce système comprenant plusieurs protéines membranaires est associé à de nombreux processus cellulaires présents dans le cancer tels que la prolifération, la transformation et l'adhésion (Z. Zhang et al. 2012; Singhal et al. 2008; Z. Hu et al. 2012; Biswas et al. 2011; Lantero et al. 2012).

Le métabolisme de la méthionine est grandement modifié lors du développement d'une tumeur (Isselbacher 1972). En effet, la demande en méthionine est importante au sein de la tumeur et la présence de la méthionine dans le milieu est essentielle à la prolifération des cellules. Il est maintenant connu que les transporteurs permettant l'acheminement de la méthionine vers la tumeur sont plus fortement exprimés dans le réseau vasculaire qui lui est associé (Isselbacher 1972; Miyagawa et al. 1998). De plus, la méthionine est un important donneur de groupement méthyle dans les processus de transméthylation. Ce phénomène a été démontré comme étant augmenté dans les cellules cancéreuses au niveau des ARN de transfert, ce qui change leurs propriétés de codage (Hoffman 1985).

L'ensemble de ces phénomènes associés à la méthionine dans les tumeurs cancéreuses en font un traceur intéressant en imagerie moléculaire. Le pancréas et le foie sont les tissus qui accumulent la plus grande quantité de ¹¹C-méthionine (¹¹C-Met) dans un animal sain, suivis ensuite par la tumeur dans plusieurs modèles animaux (Jager et al. 2001). Un de ces principaux avantages réside dans le fait que les macrophages et autres cellules du système inflammatoire captent très peu de méthionine. Il est donc maintenant accepté que la ¹¹C-Met, contrairement au FDG, sera moins importante dans un tissu enflammé que dans un tissu cancéreux (Kubota et al. 1989; Jager et al. 2001).

En clinique, la méthionine est principalement utilisée en raison de son très faible niveau de base dans le cerveau. À l'opposé du FDG, principal carburant du cerveau, la ¹¹C-Met ne sera captée dans ce dernier qu'en cas d'anomalie significative (Figure 7). Cette propriété en fait un traceur important dans la détection des tumeurs cérébrales, particulièrement des gliomes. Dès la fin des années 1980, plusieurs études ont tenté d'évaluer les capacités diagnostiques de la ¹¹C-Met. Une augmentation du captage a été observée dans plus de 80% des cas dans la majorité des études.

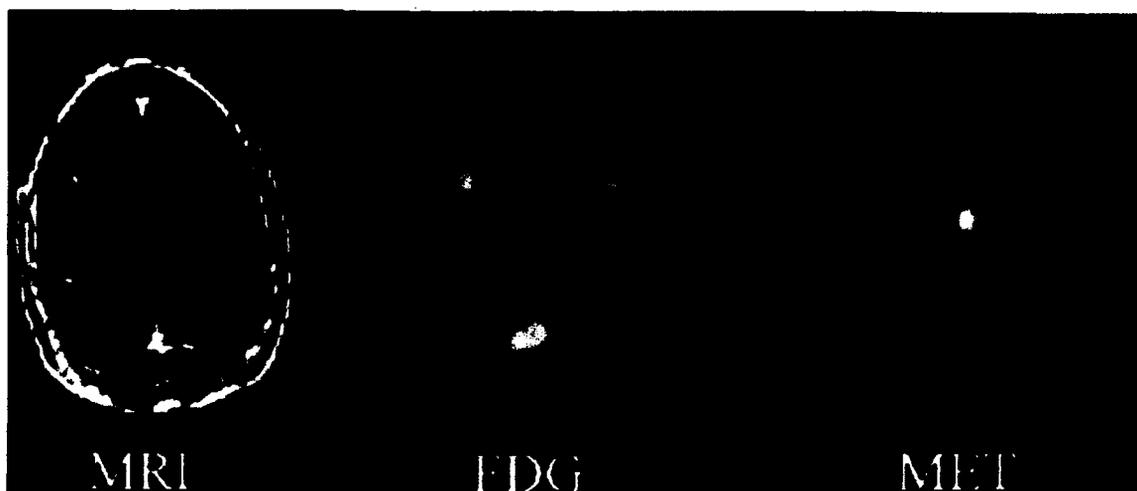


Figure 7. Gliome cérébral visualisé à l'aide de l'IRM et de la TEP au FDG ou à la méthionine. Il est intéressant de noter que le gliome montre une faible, et difficilement détectable diminution du captage de FDG alors que l'augmentation du captage de la méthionine ressort fortement en raison du faible niveau de base. Extrait de (Coleman 2007b; Singhal et al. 2008).

Depuis 2000, un très petit nombre d'études a utilisé ce traceur afin de faire un suivi dans des modèles de rongeurs. Le groupe de Zhao a réussi à faire la différence entre un granulome bénin et une tumeur intra-musculaire chez la souris. À chaque fois que la ^{11}C -Met a été évaluée dans ce modèle, une augmentation significative du captage a été observée seulement dans la tumeur. Par contre, le FDG n'arrivait à faire le départage entre les deux conditions que dans 50% des cas (Lyseng-Williamson 2008; S. Zhao et al. 2008; Rachner et al. 2010; Ottewell et al. 2009; Ottewell et al. 2008; Dass and Choong 2007). Cette étude montre donc que la ^{11}C -Met serait donc plus spécifique que le FDG. Cela a été confirmé par la suite dans une seconde étude avec un protocole plus standardisé (Coleman et al. 2008; S. Zhao et al. 2011). Par contre, une autre étude a soulevé certaines limites de ce traceur dans le suivi de la réponse à la radiothérapie. La ^{11}C -Met n'est parvenu à montrer les effets du traitement qu'immédiatement après l'administration de ce dernier. Des corrélations entre le volume de tumeur active et le niveau de captage ont été observées, mais n'étaient pas toujours significatives (Moser 1990; Murayama et al. 2009). La valeur du traceur ^{11}C -Met dans les tumeurs osseuses n'est pas connue car elle n'a pas été évaluée de façon systématique. Par contre, des observations circonstanciées ont été rapportées chez des patients atteints de cancer de la thyroïde (Jacobson and Fogelman 1998; Phan et al. 2008) et du sein (Türkbey et al. 2010; Lindholm et al. 2009).

Une métastase osseuse agit de façon importante sur le métabolisme de son environnement. La tumeur osseuse peut donc être imagée de façon indirecte par un traceur spécifique au remodelage osseux. Le fluorure de sodium marqué au fluor-18 ($^{18}\text{F-NaF}$), est un traceur qui a attiré une seconde vague d'enthousiasme récemment après sa découverte dans les années 60 (Türkbey et al. 2010; Blau, Nagler, and Bender 1962). Le perfectionnement des techniques d'imagerie TEP et la réduction des coûts font maintenant de ce traceur une alternative de choix à la scintigraphie osseuse (Czernin, Satyamurthy, and Schiepers 2010).

Une fois le traceur injecté par voie intraveineuse, le ^{18}F -ionique passe du plasma sanguin à l'espace interstitiel et se lie rapidement à la matrice osseuse en formation. Les ions fluorure prennent la place du groupement hydroxyle sur les cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) de l'os et forment ainsi de la fluoroapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) (Northam et al. 2011; Czernin, Satyamurthy, and Schiepers 2010). La quantité de fluorure accumulé dans le tissu dépend de la quantité de matrice osseuse exposée. Dans le cas de lésions ostéoblastique ou mixte, le remodelage osseux augmenté représente un milieu propice à l'incorporation d'une plus grande quantité de traceur (plus de matrice exposée). Cela fait en sorte qu'en présence de ce remodelage, une tumeur osseuse devient détectable grâce au $^{18}\text{F-NaF}$.

Ainsi, l'imagerie TEP au $^{18}\text{F-NaF}$ est devenue une procédure relativement courante en clinique afin de détecter les métastases osseuses. Plusieurs études ont démontré la supériorité du $^{18}\text{F-NaF}$ par rapport aux autres techniques courantes telles que la scintigraphie osseuse et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) (Moynagh et al. 2010; Tateishi et al. 2010; Grant et al. 2008; Even-Sapir et al. 2006) (Figure 8).



Figure 8. Visualisation des métastases osseuses chez un même patient à l'aide, de gauche à droite, des plans antérieurs et postérieurs en scintigraphie osseuse, puis ensuite en SPECT et en TEP au NaF. L'imagerie SPECT détecte plus de lésions que la scintigraphie alors que la TEP détecte plus de tumeurs que les autres modalités. Extrait de (Müller-Horvat et al. 2006; Grant et al. 2008).

Il a aussi été observé que l'exécution d'une imagerie TEP au ^{18}F -NaF avait entraîné une modification importante de la stratégie de traitement chez des patients ayant d'abord passé une scintigraphie osseuse. Lors d'une de ces études, 8% à 10% des patients ont vu leur prise en charge clinique modifiée (Dellestable et al. 2011; Hetzel et al. 2003). Le ^{18}F -NaF a aussi été comparé à quelques reprises au ^{18}F -FDG au cours des dernières années. Pour certains types de métastases osseuses, en particulier au niveau de la colonne vertébrale mais aussi dans les os longs, le ^{18}F -NaF a démontré une sensibilité plus élevée que le ^{18}F -FDG (Hausmann et al. 2011; Krüger et al. 2009; Iagaru et al. 2011). Le suivi de traitement est aussi possible chez l'humain à l'aide de ce traceur. Une étude britannique a tenté de corrélérer les valeurs de SUVmax avec les niveaux sanguins d'antigène prostatique spécifique et d'alkaline phosphatase (marqueurs de formation osseuse) à la suite d'un traitement de radiothérapie (^{223}Ra -chlorure) (Kundra et al. 2007; Cook et al. 2011). Douze semaines après le traitement, les patients qui ont vu leur taux d'antigène prostatique diminué ont également vu le SUVmax des métastases réduit. Par contre, il a été plus difficile d'établir un tel lien entre l'imagerie et le niveau d'alkaline phosphatase circulante.

Encore une fois, un nombre limité de groupes de recherche ont utilisé le traceur $^{18}\text{F-NaF}$ pour caractériser des modèles de métastases osseuses chez le rongeur. En effet, au moment d'écrire ces lignes et excluant nos propres études, seulement trois articles sont disponibles pour de tels modèles. La première étude visait d'ailleurs à optimiser et à rendre reproductible la procédure d'imagerie TEP avec le traceur (Murakami et al. 2008; Berger et al. 2002). Les auteurs visaient aussi à prouver la capacité de la technique à détecter et à faire le suivi des lésions osseuses dans le temps. Ils ont vérifié leurs hypothèses à l'aide d'un modèle d'injection intra-tibiale de cellules cancéreuses prostatiques (PC-3 et LAPC-9) chez la souris. La valeur de captage standardisé (SUV) obtenue du côté ipsilatéral était environ 5 fois plus élevée que le côté controlatéral du même animal. Les mêmes souches de cellules tumorales ont été utilisées dans un modèle similaire en 2008 (Rozel et al. 2009; Hsu et al. 2008). Cette fois, les caractéristiques de lésions ostéolytiques et ostéoblastiques ont été observées avec le $^{18}\text{F-NaF}$ et le $^{18}\text{F-FDG}$. Les lésions lytiques voyaient le captage de $^{18}\text{F-NaF}$ diminué dans la région de la tumeur alors qu'une forte augmentation était détectée dans les lésions blastiques (Figure 9). Cette dernière augmentation du traceur dans la lésion était corrélée avec le contenu osseux mesuré en μCT (volume osseux (BV)/volume total (TV)). Une seconde étude de cette équipe a permis d'évaluer les effets de la protéine BMP sur la tumeur osseuse (Virk et al. 2009)

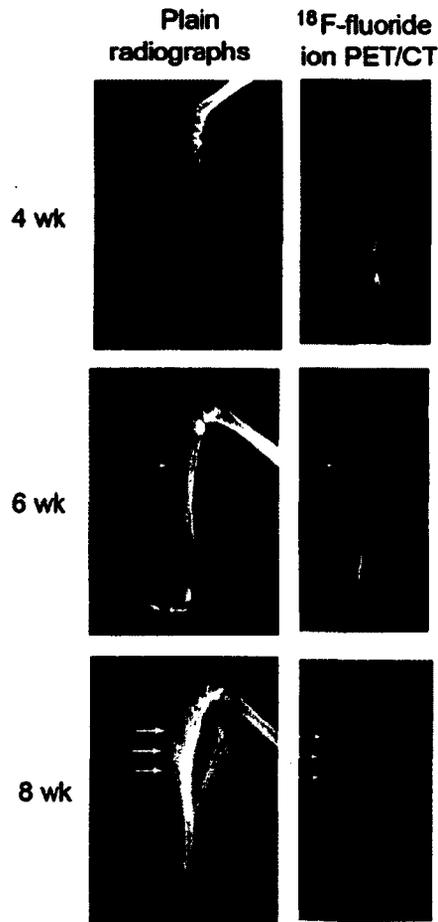


Figure 9. Imagerie TEP d'un modèle de métastases osseuses issues de l'injection intra-tibiale de cellules prostatiques LAPC-9. La tumeur à caractère sclérotique provoque une forte augmentation du captage du NaF au niveau de l'os atteint. On observe une progression dans le temps. Extrait de (Hsu et al. 2008).

Dans le cas des trois traceurs présentés, il est frappant que leur utilisation a fait l'objet de très peu d'études pré-cliniques sur les métastases osseuses. Le manque à gagner par rapport aux investigations cliniques est important, surtout qu'il est plus facile de tirer des conclusions mécanistiques dans les modèles animaux. L'étendue des analyses à la suite des expériences *in vivo* et post mortem permettra d'optimiser l'utilisation des traceurs TEP et d'accroître leur champ d'utilisation.

5. Co-registation IRM/TEP pour une meilleure visualisation et un meilleur suivi.

Les techniques *in vivo* de détection des processus cellulaires sont de plus en plus sophistiqués et leur valeur clinique est maintenant largement reconnue, particulièrement en oncologie. Aussi le développement d'outils d'imagerie moléculaire passe obligatoirement par la mise au point d'approche multimodale et ce, afin de tirer le maximum d'information du patient à l'aide de techniques complémentaires en une seule procédure. La combinaison entre les données moléculaires, fonctionnelles et morphologiques qu'amène la co-registation de l'IRM et de la TEP représente selon certains experts le futur de la médecine diagnostique (Sauter et al. 2010). L'équipement disponible rend maintenant possible la co-registation séquentielle (une modalité après l'autre dans une même pièce). Par contre, des scanners intégrant les deux modalités sont de plus en plus proches de la pratique clinique. Il est d'autant plus intéressant d'évaluer le potentiel de cette bi-modalité dans les modèles précliniques afin de répondre aux besoins de la clinique, voir même de les dépasser. Le grand potentiel de l'imagerie IRM/TEP a d'abord été démontré dans les pathologies liées au cancer et en neurologie (Schwenzer et al. 2012a; Schwenzer et al. 2012b). Ainsi, la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, le potentiel métastatique et le métabolisme cellulaire sont des caractéristiques de la tumeur visualisées et quantifiées en TEP qui sont grandement bonifiées par l'information anatomique obtenue avec l'IRM.

Le principal défi de la co-registation IRM/TEP réside dans le fait que l'on doit éviter les interférences que l'appareillage TEP peut provoquer sur le champ magnétique, altérant ainsi la prise de données en IRM. Les changements importants de champs magnétiques propres à l'IRM peuvent aussi interférer avec les détecteurs sensibles de la TEP. Ces limitations sont encore d'actualité aujourd'hui, malgré les efforts déployés en recherche (Wehrl et al. 2009). L'acquisition séquentielle permet toutefois de contourner le problème lorsque les installations le permettent. Le futur de l'imagerie moléculaire, soit les sondes multimodales pouvant être détectées à l'aide des deux types de scanner, peuvent donc

continuer à être développées. Le potentiel de la co-registation IRM/TEP reste indéterminé mais peut continuer à aider la recherche préclinique à faire avancer les connaissances en oncologie (Beyer et al. 2011).

6. Douleur cancéreuse osseuse : généralités.

L'os, ou plus précisément le squelette, apparaît généralement aux yeux de la population comme un organe simple et statique. Au contraire, les os sont un organe très actif métaboliquement (Risteli et al. 1993). Leur solidité est assurée par un fin équilibre entre la perpétuelle formation et la dégradation (résorption). Ce processus est assuré au niveau de la moelle osseuse par plusieurs types cellulaires différents tel que décrit précédemment.

L'os est aussi un organe densément innervé et vascularisé. La présence de terminaisons libres et de vaisseaux sanguins autant dans la moelle osseuse que dans la matrice minéralisée ou dans le périoste a été démontrée (Mach et al. 2002) (Figure 10).

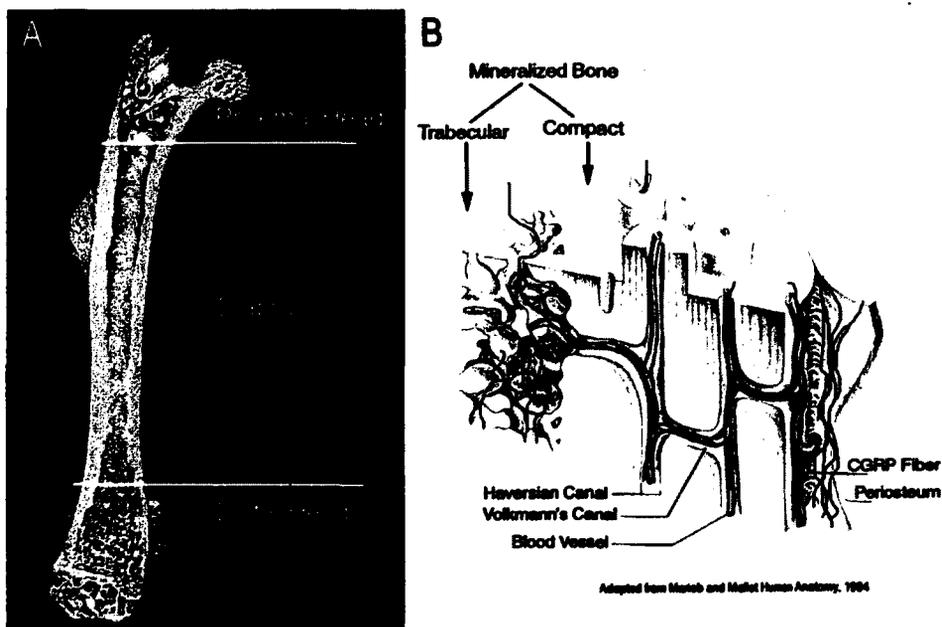


Figure 10. Anatomie simplifiée de l'os minéralisé. Noter la dense vascularisation et l'innervation tant de l'os compact que de l'os trabéculaire (droite). Extrait de (Mach et al. 2002).

De plus, l'innervation de l'os est telle qu'il est possible d'émettre des signaux nociceptifs à partir de chacune de ces structures. Par exemple, la présence de *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), exprimé par une sous population de fibres C non-myélinisées retrouvées dans l'os laisse supposer un rôle afférent relié à la nociception comme c'est le cas dans d'autres tissus contenant ces neurones (e.g. la peau). La distension du périoste a aussi été identifiée comme une source majeure de douleur osseuse sévère dans les cas de cancer (Coleman 1997). La plasticité de ce réseau neuronal et son rôle dans la douleur osseuse seront abordés un peu plus loin dans cette section.

Lorsqu'une métastase élit domicile dans l'os, un nombre important de modifications du micro-environnement déclenche de la douleur et assure son maintien (P. W. Mantyh et al. 2002)(Figure 11). D'abord, en prenant de l'expansion, la tumeur peut exercer une pression directe sur les terminaisons nerveuses ou les vaisseaux sanguins et provoquer une distension des tissus. Cette première douleur est dite neuropathique et la description de cette douleur chez une partie des patients atteints concorde avec l'hypothèse d'une douleur de type neurogène (Mercadante and Fulfaro 2007). Par la suite, les cellules tumorales et stromales (macrophages, neutrophiles, lymphocytes) relâchent un certain nombre de facteurs afin de stimuler leur environnement et faciliter leur croissance (pour un rappel, voir la figure 2). Plusieurs de ces facteurs sont directement impliqués dans la genèse de la douleur cancéreuse en raison de leurs propriétés proalgésiques. Une liste non exhaustive des principales molécules jouant un rôle à ce niveau se trouve dans le tableau 4.

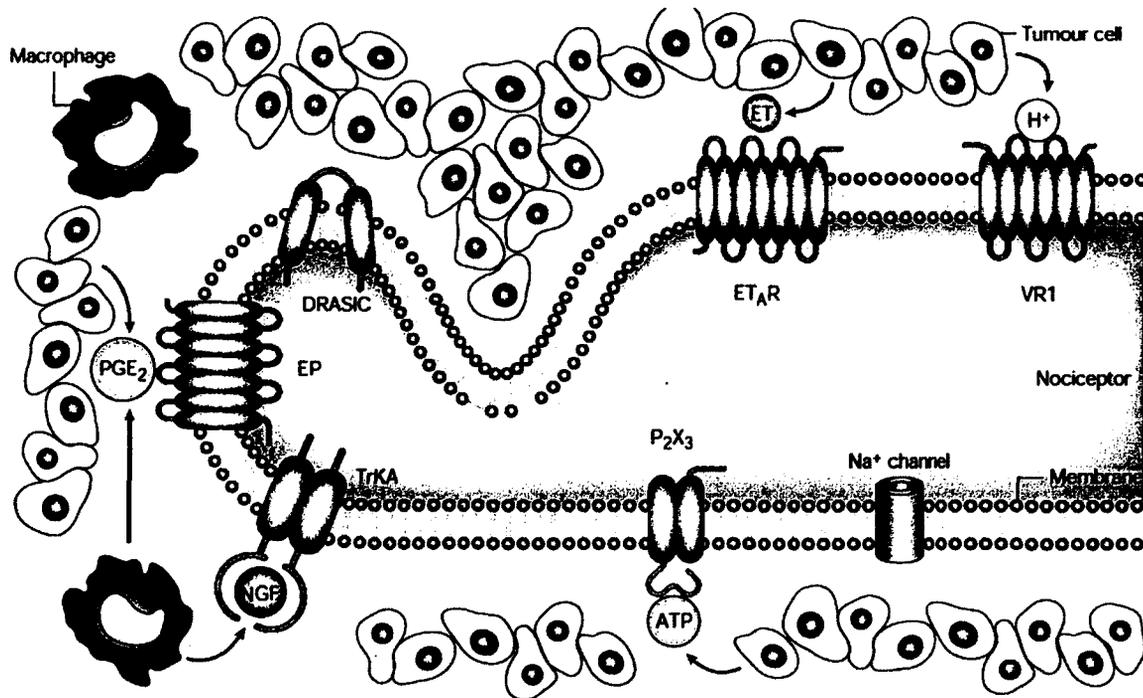


Figure 11. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la douleur cancéreuse au niveau périphérique. Les récepteurs présents sur le nocicepteur lient les molécules sécrétées par les macrophages et les cellules tumorales, ce qui déclenche le signal nociceptif. Extrait de (Mantyh 2002).

| | |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Interleukine-1 (IL-1) | (Baamonde et al. 2007), (R.-X. Zhang et al. 2007) |
| Prostaglandine E ₂ (PGE ₂) | (Inada et al. 2007), (Kobayashi et al. 2012), (Fox et al. 2004) |
| Endothéline 1 | (Peters et al. 2004), (Wacnik et al. 2001) |
| Adénosine triphosphate (ATP) | (Gilchrist et al. 2005), (Kaan et al. 2010); (J. X. Wu et al. 2012) |
| Facteur de croissance nerveux (NGF) | (Sevcik et al. 2005a); (Halvorson et al. 2005); (W. G. Mantyh et al. 2010); (Jimenez-Andrade et al. 2011) |
| CGRP | (Mach et al. 2002); (Bloom et al. 2011) |
| Bradykinine | (Sevcik et al. 2005b) |

Tableau 4. Liste non-exhaustive des principales molécules inflammatoires impliquées dans le développement de la douleur cancéreuse osseuse.

Plusieurs de ces molécules ont pour fonction, entre autres, de déclencher une cascade inflammatoire en réaction à la croissance de la tumeur. Cette inflammation est aussi un facteur important dans le développement de la douleur cancéreuse puisque certaines des molécules sécrétées dans ces conditions viennent stimuler directement les nocicepteurs en liant leur récepteur présent sur ceux-ci. Parmi ces molécules, le NGF a fait l'objet d'études particulièrement poussées par le groupe de Mantyh (Watson, Allen, and Dawbarn 2008; P. W. Mantyh et al. 2011). Ce facteur de croissance est à la fois relâché par les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires associées à la tumeur. Une fois abondant dans l'environnement, le NGF peut d'abord activer directement les nocicepteurs via son récepteur TrkA. Il est d'ailleurs impliqué dans la sensibilisation des afférences primaires mais aussi dans la sensibilisation centrale qui sera abordée plus loin. Par la suite, il induit un bourgeonnement (sprouting) des fibres nerveuses sensitives et sympathiques, particulièrement dans le périoste ce qui exacerbe encore plus la douleur. Le phénomène a récemment été comparé au névrome présent chez les patients ayant subi une amputation. Ce phénomène a été contré dans un modèle animal à l'aide d'inhibiteurs des récepteurs Trk et d'anticorps neutralisants dirigés contre le NGF et ce, à la fois dans le cancer prostatique,

mammaire et d'un cancer primaire de type fibrosarcome (voir tableau 3). Le NGF semble donc être une avenue prometteuse dans le soulagement de la douleur cancéreuse.

Finalement, un phénomène très important dans la genèse et le maintien de la douleur osseuse en cancer est l'acidose localisée. En effet, l'activité des ostéoclastes est fortement augmentée dans l'environnement osseux en présence de métastases (Clohisy et al. 1996; Clohisy and Ramnaraine 1998). Pour assurer le processus de résorption, les ostéoclastes maintiennent un pH élevé dans leur voisinage afin de pouvoir résorber la matrice osseuse. Lorsqu'il y a déséquilibre entre la formation et la résorption, le pH de tout l'environnement osseux est abaissé et il en résulte l'activation des récepteurs et des canaux sensibles à des concentrations élevées d'ions H^+ . Plus précisément, les récepteurs transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) et les canaux ioniques sensibles à l'acide de type 2 et 3 (ASIC2/3) ont été impliqués dans la sensibilisation des nocicepteurs au niveau périphérique suite à l'acidification du milieu (Yoneda et al. 2011; Nagaie, Hiraga, and Yoneda 2007; Honore et al. 2009; Ghilardi et al. 2005). De nombreux traitements visent à contrer ce phénomène particulier et seront décrits plus loin dans cette section. Il est à noter que le pH intra- et extracellulaire des cellules tumorales est également plus bas que le pH physiologique, ce qui contribue à amplifier le phénomène (Griffiths 1991).

Les trois phénomènes décrits plus hauts – la douleur neuropathique, l'inflammation locale et l'acidose – contribuent de manière significative à l'induction et à la perpétuité de la douleur cancéreuse osseuse. Ils produisent une douleur décrite comme lancinant et continue d'intensité généralement de faible à modérée. Elle est par contre accompagnée par des événements soudain de douleur spontanée sévères. Ces événements peuvent être provoqués par un stimulus tel que le changement de position, la charge pondérale ou l'activité (marche) mais aussi survenir de façon inattendue. Ce sont ces épisodes spontanés qui sont particulièrement difficiles à traiter (Mercadante 1997). La combinaison de ces phénomènes en fait d'ailleurs un type de douleur unique qui n'est pas la somme des syndromes de douleur neuropathique et inflammatoire que nous connaissons (Honore and Mantyh 2000). Lorsque que cette douleur ressentie au niveau périphérique se prolonge dans le temps, la chronicisation de cette stimulation périphérique constante et croissante

conduit à une sensibilisation au niveau du système nerveux central. Encore une fois, plusieurs médiateurs ont été étudiés dans ce phénomène tant au niveau moléculaire que cellulaire. Il est alors apparu que la douleur cancéreuse se démarquait des autres types de douleur autant par la diversité de ces marqueurs centraux que dans les possibilités de traitements dont nous disposons.

7. Sensibilisation centrale.

Les patients arrivent à décrire leur douleur, ce qui donne un indice du niveau de sensibilisation qu'ils subissent dans un contexte de douleur chronique. Par contre, il est impossible de déterminer les mécanismes cellulaires qui entrent en jeu, tout comme dans des études comportementales animales. Les chercheurs disposent alors de plusieurs moyens de mieux comprendre les changements se produisant au niveau spinal, dont l'électrophysiologie *in vivo* et l'histochimie sur tissus (Gordon-Williams and Dickenson 2007).

Le principal neurotransmetteur excitateur responsable de la transmission du signal nociceptif est le glutamate, entre autres via le récepteur NMDA. Le maintien d'un stimulus dans le temps (i.e. une relâche continue de glutamate au niveau spinal) entraînera deux phénomènes engendrant de l'hypersensibilité chez les neurones exprimant ce récepteur : la sommation temporelle (*wind-up*) et la potentialisation à long terme (LTP). Brièvement, le *wind-up* fera en sorte que la réponse sera de plus en plus forte pour un stimulus donné. Un stimulus pas ou peu douloureux peut alors devenir très douloureux puisque la réponse neuronale à ce stimulus est exagérée. Ce phénomène peut finir par toucher tous les types de fibres sensorielles, incluant celles qui sont normalement non-nociceptives telles que les fibres A β . La LTP fera en sorte que le neurone stimulé maintiendra son état d'excitation même si le stimulus n'est plus présent. Ainsi, la douleur sera maintenue en dehors des épisodes de douleur spontanée ressentis par les patients lors d'une activité du quotidien telle que la marche ou un mouvement plus soudain. Ces deux phénomènes sont

probablement à la base de l'allodynie et de l'hyperalgésie éprouvées par les patients atteints de métastases osseuses.

Les fibres afférentes primaires responsables de la transmission de la douleur sont les fibres A δ et C (Julius and Basbaum 2001). Ces fibres projettent de la périphérie jusqu'à la couche superficielle de la corne dorsale de la moelle épinière (lame I). Ces neurones afférents ainsi que les neurones de la moelle épinière sont alors surexcitées en présence de douleur osseuse et vont décharger spontanément ou à la suite de stimuli moins importants (Urch, Donovan-Rodriguez, and Dickenson 2003; Donovan-Rodriguez, Dickenson, and Urch 2004). Ces stimuli non nociceptifs auront, par exemple, le pouvoir de provoquer la relâche de substance P et l'internalisation de son récepteur, ce qui n'est induit normalement que par des stimulations douloureuses (Schwei et al. 1999). Cette hyperexcitabilité va aussi se traduire par des changements au niveau neurochimiques dans la moelle épinière (Schwei et al. 1999; Honoré et al. 2000). Au cours des années, un certain nombre de molécules dont l'expression est modifiée en réponse à la douleur osseuse a été identifié (e.g. l'activation du gène C-fos et une expression accrue de dynorphine). Aussi, la phosphorylation de la protéine p38 MAP kinase est augmentée dans ces conditions (Svensson et al. 2008). Par contre, un grand nombre de protéines qui sont normalement associées à des douleurs neuropathiques et/ou inflammatoires telles que la substance P, la galanine ou la PKC- γ ne sont pas modifiés dans la moelle osseuse (Honoré et al. 2000). Cela renforce l'idée que la douleur cancéreuse produit une signature unique qui, malgré les composantes neuropathiques et inflammatoires qui lui sont attribuées, n'est ni une somme, ni une combinaison de ces deux conditions (Voir tableau 4). L'étude de nouveaux traitements en est d'autant plus complexe et laisse supposer que notre compréhension de la douleur cancéreuse gagnerait encore à être améliorée au niveau des marqueurs neurochimiques.

| | | | |
|-------------------------------|--------|--------|---|
| c-fos | + | + ou = | + |
| Dynorphine | + | + | + |
| GFAP | + ou = | + | = |
| ATF-3 | + | + | + |
| CD68 ou ED1 (macrophages) | + | + | + |
| Substance P | = | - | + |
| IB4 | = | - | = |
| CGRP | = | - | + |
| Galanine | = | + | = |
| Neuropeptide Y | = | + | = |
| Récepteur à la substance P | = | + | + |
| PKC γ | = | + | + |
| GAP-43 | = | + | = |
| OX-42 ou Iba-1 (microglie) | = ou + | + | = |

Tableau 5. Expression spinale des marqueurs neurochimiques examinés dans les 3 principaux types de douleur étudiés chez le rongeur. Les marqueurs pour lesquels des différences importantes existent entre les types de douleurs sont écrits en rouge. Information extraite de (Honore et al. 2000 ; Wang R. et al. 2003 ; Sevcik et al. 2005 ; Halvorson et al. 2006 ; Ruscheweyh et al. 2007)

Les modifications histochimiques dans la moelle épinière ne sont pas exclusivement observées dans les neurones. Les cellules gliales ont un rôle à jouer dans la majorité des syndromes de douleur chronique (Gosselin et al. 2010). C'est également le cas en douleur cancéreuse.

Les astrocytes sont identifiées à l'aide de l'expression du marqueur de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Ces cellules de support du système nerveux central contribuent à la régulation de tous les aspects de la fonction neuronale. Il n'est donc pas étonnant que les astrocytes soient modifiés en présence de douleur cancéreuse. Plus précisément, le marquage au GFAP est augmenté de manière unilatérale dans différents modèles de cancer des os chez les rongeurs et la morphologie des astrocytes est aussi modifiée (Honoré et al. 2000; R.-X. Zhang et al. 2005; Hald, Nedergaard, et al. 2009; Lan et al. 2010; Yao et al. 2011). Les astrocytes ont plutôt été associés au maintien tardif de la douleur. De manière moins éloquente et plus récente, la microglie, cellules immunitaires résidentes du système nerveux central, a été impliquée dans le développement plus précoce de la douleur (Inoue,

Tsuda, and Tozaki-Saitoh 2007; Geis et al. 2010; Wang et al. 2012; Mao-Ying et al. 2012; J.-H. Hu et al. 2012). Les marqueurs servant à identifier la microglie dans la moelle sont plus diversifiés (MAC1, Ox-42, Iba1). Les résultats obtenus varient beaucoup en fonction du modèle, mais aussi du marqueur choisi dans l'étude.

8. Les modèles animaux

Jusqu'à la fin des années 90, notre compréhension de la douleur cancéreuse était très sommaire et était basée surtout sur les observations faites chez des sujets humains et sur les connaissances que nous avons acquies sur la douleur grâce à des modèles de pathologies connexes (neuropathique, inflammatoire, post-chirurgical, etc.) (Mercadante 1997). C'est alors que la première étude évaluant la douleur chez des animaux porteur d'une tumeur osseuse a été publiée par le groupe de Patrick Mantyh (Schwei et al. 1999). Ce modèle développé chez la souris C3H/HeJ consiste en l'injection de cellules de fibrosarcome NCTC2472 dans le canal médullaire du fémur suite à une arthrotomie (une rupture du tendon patellaire afin d'accéder à la capsule articulaire pour l'injection). Environ 11 à 14 jours après l'injection, les animaux développent de l'allodynie mécanique et de l'inconfort se manifestant par une diminution de l'utilisation de la patte en condition normale ou forcée. Ce modèle a ouvert la voie à de très nombreuses études provenant de ce groupe (voir tableau 4). Il a aussi été repris par d'autres équipes afin, principalement, de caractériser plus en profondeur les modifications neurochimiques se produisant dans le système nerveux mais aussi au niveau de l'os ou encore de tester de nouvelles avenues thérapeutiques.

Ce premier modèle chez la souris a été modifié à plusieurs reprises tant au niveau du site d'injection des cellules que de la souche cellulaire utilisée. De plus, le modèle de douleur cancéreuse à injection intra-osseuse a été transféré chez le rat en 2002 (Medhurst et al. 2002). Cette fois, ce sont des cellules syngéniques de carcinome mammaire MRMT-1 qui ont été injectées dans le tibia de l'animal. Ce modèle a également donné lieu à d'autres études par la suite (tableau 6). Les modèles NCTC2472 et MRMT-1 sont encore aujourd'hui les modèles qui sont le plus souvent repris pour poursuivre la recherche préclinique dans

le domaine de la douleur cancéreuse. Cependant, Il a rapidement été découvert qu'il existait des variations entre les modèles selon la souche cellulaire ou le site d'injection choisi. C'est pourquoi, en plus des deux principaux modèles utilisés, d'autres souches cellulaires représentant des cancers prostatiques, pulmonaires, hépatiques, intestinales ou encore de type mélanome ont aussi été utilisées chez les rongeurs.

| Modèle animal | Type de cancer | Site d'injection | Nombre d'animaux | Références |
|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Souris C3H/HeJ | Fibrosarcome syngénique NCTC2472 | Fémur Tibia Talon Humérus | 54 | (Schwei et al. 1999; Honore et al. 2000; Luger et al. 2002; Menéndez et al. 2003; King et al. 2007; Hald, Nedergaard, et al. 2009; Wacnik et al. 2001) |
| Rat Sprague-Dawley | Carcinome Mammaire MRMT-1 | Tibia Fémur | 17 | (Medhurst et al. 2002; Urch, Donovan-Rodriguez, and Dickenson 2003; Doré-Savard et al. 2010) |
| Rat Wistar | Carcinome mammaire Walker 256 | Tibia | 11 | (Mao-Ying et al. 2006; Pan, Zhang, and Zhao 2010; Yao et al. 2011) |
| Souris C3H ou Balb/cJ | Carcinome mammaire 4T1 | Fémur | 3 | (Hansen et al. 2011; Zwolak et al. 2008) |
| Rat Copenhagen | Carcinome prostatique AT-3.1 | Tibia | 4 | (R.-X. Zhang et al. 2005; Kolosov et al. 2011) |
| Souris athymiques nues | Cancer prostatique canin ACE-1 | Fémur | 3 | (Halvorson et al. 2005; Jimenez-Andrade et al. 2010) |
| Souris C3H/HeJ | Hépatocarcinome Hca-1 | Surface dorsale de la patte | 3 | (Seong et al. 2004) |
| Souris C57bl/6 | Mélanome B16-F10 | Fémur | 2 | (Sabino et al. 2003) |
| Souris C3H/SCID | Carcinome du colon C26 | Fémur | 1 | (Sabino et al. 2003) |
| Souris athymiques nues | Carcinome mammaire humain MDA-MB-231 | Fémur | 1 | (Bloom et al. 2011) |
| Souris Balb/c-C3H | Adenocarcinome mammaire 66.1 | Fémur | 1 | (Sukhtankar et al. 2011) |
| Souris C57bl/6J | Fibrosarcome syngénique MCS7G | Fémur | 1 | (Geis et al. 2010) |

Tableau 6. Liste détaillée des modèles animaux utilisés afin de mimer la douleur cancéreuse chez l'animal.

9. Méthodes d'évaluation de la douleur cancéreuse

La douleur cancéreuse se manifeste chez l'animal de plusieurs façons. L'objectif ici n'est pas de décrire toutes les méthodes possibles, mais de présenter brièvement les plus utilisées. Chez la souris, des changements comportementaux tels que le soulèvement de la patte afin d'éviter le contact avec le sol ou encore un lèchement, un mordillement ou un secouement excessif surviennent tôt dans le développement de la douleur et sont comptabilisés par méthode visuelle (Schwei et al. 1999). Par contre, ces comportements sont peu présents chez le rat et ne permettent pas d'observer une évolution claire dans l'intensité de la douleur.

Le principal point commun entre les différents modèles de douleur osseuse provoquée par une tumeur, peu importe l'espèce étudiée et la localisation de la tumeur, est le développement progressif d'hypersensibilité mécanique. Cette hypersensibilité est habituellement mesurée à l'aide du test de von Frey. Ce test a été caractérisé afin d'induire une stimulation non-nociceptive chez un animal sain, mais induisant un signal nociceptif chez un animal hypersensible dès le début des années 90 (Chaplan 1994). Le réflexe de retrait entraîné par la faible stimulation est alors enregistré et sert de mesure d'allodynie mécanique. La validité de ce test a été démontrée à plusieurs reprises, surtout dans des modèles de douleur neuropathiques et inflammatoire. Chez le rat neuropathique, des mesures électrophysiologiques *in vivo* ont montré que la proportion des neurones spinaux se trouvant dans le champ récepteur du nerf lésé passait de 10% à près de 50% (Laird et Bennett 1993). De plus, chez les primates, des études semblables ont démontré que les singes neuropathiques avaient un seuil de sensibilité plus bas se caractérisant par une intensité, et un débit plus élevé de décharge des neurones périphériques retrouvés à proximité de la lésion (Palescek et al. 1992). Ces quelques études ont été l'amorce d'une longue caractérisation des effets électrophysiologiques d'une stimulation à l'aide des poils de von Frey. Ce test représente aujourd'hui la base de l'évaluation de la douleur chez l'animal.

Plus récemment, les tests basés sur les réflexes de retrait ont fait l'objet d'un débat dans la communauté scientifique. On leur attribue en partie le faible transfert des drogues approuvées en études précliniques vers le patient (Kissin 2010). En effet, de nouvelles techniques visant à mettre de l'avant l'évaluation de comportements plus « naturels » chez l'animal tels que des changements dans la posture et la démarche ont fait l'objet d'un développement important par le domaine académique et aussi commercial (Min et al. 2001; Vrintent et al. 2003; Boettger et al. 2009). Ces paramètres liés à la posture et à la charge pondérale sont inspirés d'observations cliniques (Wickman et al. 2004 ; van der Leeden et al. 2008 ; Portenoy et al. 2010), c'est pourquoi la communauté travaillant sur la douleur a bon espoir que de tels appareils pourront améliorer notre criblage des cibles thérapeutiques potentielles en douleur. Parmi ceux-ci, nous avons privilégié le développement et par la suite l'utilisation du test de distribution pondérale dynamique (Dynamic Weight Bearing ou DWB) (Tétreault et al. 2011). Ce test consiste en une cage permettant à l'animal de se déplacer relativement librement dont le plancher est constitué d'une grille de capteurs de pression (44 x 44). À l'aide de cet appareil, il est possible d'enregistrer en temps réel le poids porté par chacun des points de contact de l'animal avec le sol, y compris les pattes avant et la queue. Ceci représente une évolution importante par rapport aux appareils de distribution pondérale conventionnels qui ne mesuraient que les pattes arrière en position bipède. Même si les résultats produits par cet instrument de mesure sont difficilement transférables à l'humain, ils permettent de faire une évaluation plus réaliste de ce qui se passe chez les rongeurs. Le DWB a par conséquent fait l'objet de quelques publications récentes et est amené à être utilisé plus abondamment dans l'avenir (Cobos et al. 2012 ; Robinson et al. 2012). Il faut toutefois être prudent dans l'association de la douleur avec le changement dans la posture de l'animal. D'autres études sont nécessaires afin de venir compléter les études descriptives qui existent aujourd'hui. Les questions qui subsistent quant à la capacité des analgésiques conventionnels à rétablir les paramètres mesurés par le DWB viendront nous éclairer sur les possibilités de cet appareil dans l'évaluation de la douleur.

10. Avenues thérapeutiques étudiées

Outre une meilleure compréhension des mécanismes régissant la douleur cancéreuse, le rôle des modèles animaux est d'abord de tester différentes options thérapeutiques pour améliorer la condition des patients. La plupart des modèles énumérés dans le tableau 4 a servi à cette fin. Les méthodes d'évaluation sont multiples, de l'approche comportementale à l'électrophysiologie en passant par les méthodes moléculaires. Une liste non exhaustive des avenues étudiées se trouve dans le tableau 5.

D'un point de vue comportemental, l'allodynie mécanique et l'usage du membre portant la tumeur sont les deux aspects les plus étudiés en douleur cancéreuse. L'allodynie mécanique se mesure à l'aide du test utilisant des stimulations avec des poils de von Frey (Chaplan et al. 1994). Ce test permet de mesurer le réflexe de retrait de l'animal en présence d'un stimulus qui n'entraîne pas de douleur chez un animal sain. Par contre, les animaux cancéreux, que ce soit chez la souris ou le rat, ont un seuil de retrait significativement diminué entre 7 et 14 jours après l'implantation des cellules, selon le modèle (Schwei et al. 1999; Medhurst et al. 2002). L'inconfort de l'animal se traduit aussi par un changement dans la manière dont l'animal utilise sa patte. Chez la souris, des comportements spontanés de secouement (flinching) et de soulèvement prolongé de la patte (guarding) ont été observés de manière semi-quantitative et utilisés comme mesure de douleur chez ces animaux (Luger et al. 2002; R.-X. Zhang et al. 2005). Dans certains modèles, l'hyperalgésie a été analysée chez les animaux (R.-X. Zhang et al. 2008; Khasabova et al. 2008). L'hyperalgésie (réaction exagérée suite à un stimulus douloureux), qu'elle soit thermique ou mécanique, est un phénomène marginal en douleur cancéreuse et est peu recensée à travers la littérature. Afin de vérifier l'usage de la patte en condition de marche forcée, certaines études utilisent le rotarod, un appareil servant à faire marcher l'animal sur un tube qui tourne en accélérant ou à vitesse constante (Jones and Roberts 1968; Luger et al. 2002). Cet appareil a l'avantage de forcer l'animal à se déplacer, un comportement qui est difficile à évaluer, surtout lorsque l'animal ressent une forte douleur. Plus récemment,

de nouvelles techniques tendant à mettre de côté les techniques comportementales basées sur le mouvement de retrait à un stimulus externe sont mises de l'avant. La mesure de la distribution pondérale répond bien à cette demande en douleur cancéreuse. Par contre, les appareils existants confinent l'animal à une très petite enceinte pour la prise des mesures et forcent l'animal à n'utiliser que ses pattes arrières, un comportement qui n'est pas naturel. Malgré tout, ces appareils ont donné de bons résultats lorsqu'utilisés en douleur cancéreuse (Fox et al. 2004; Niiyama et al. 2009; Hald, Hansen, et al. 2009). Plus récemment, de nouvelles techniques visant à améliorer l'évaluation de la distribution pondérale ont été mises de l'avant (Tétreault et al. 2011; Cobos et al. 2012).

Le Tableau 7 donne un aperçu des différentes avenues thérapeutiques qui ont été considérées pour le traitement de la douleur cancéreuse et qui ont fait l'objet d'une évaluation dans un modèle animal.

| | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antidépresseurs | Inhibition de la recapture des monoamines | Pharmacologique (amitryptilline, fluoxetine, propentofylline) | (Mouedden and Meert 2007a; Yao et al. 2011) |
| Antiepileptiques | Canaux calciques voltage-dépendant | Pharmacologique (Gabapentin, Lacosamide) | (Donovan-Rodriguez, Urch, and Dickenson 2006; Mouedden and Meert 2007a; Beyreuther et al. 2007) |
| Inhibiteurs de la résorption osseuse | Ostéoclastes | Pharmacologique (zoledronate, ibandronate, etc.) Immunologique (anti-RANKL) | (Sevcik et al. 2004; Halvorson et al. 2008; Roudier, Bain, and Dougall 2006; Walker et al. 2002; Luger et al. 2001) |
| Cannabinoïdes | Récepteurs CB1 et CB2 | Pharmacologique (Agonistes sélectifs ou non) | (Gu et al. 2011; Hald et al. 2008; Hamamoto, Giridharagopalan, and Simone 2007; Lozano-Ondoua et al. 2010) |
| Chimiokines | Récepteur CX3CR1 | Immunologique (anti-CX3CR1) | (Yin et al. 2010) |
| Cascade inflammatoire | COX-2 IL-1 TLR4 | Pharmacologique (inhibiteurs, antagonistes). Invalidante (siRNA) | (Medhurst et al. 2002; Fox et al. 2004; Lan et al. 2010; Baamonde et al. 2007) |
| Facteurs de croissance | NGF TrkA | Pharmacologique (inhibiteurs TrkA) Immunologique (anti-NGF) | (Ghilardi et al. 2010; W. G. Mantyh et al. 2010; Jimenez-Andrade et al. 2007) |
| Opiïdes | Récepteurs μ , δ , κ | Pharmacologique (agonistes) | (Curto-Reyes et al. 2008; Mouedden and Meert 2007b; Menéndez et al. 2005; Luger et al. 2002; Otis, Sarret, and Gendron 2011) |
| Récepteurs canaux ioniques | TRPV1 P2X3 Nav 1.8 | Pharmacologique (antagonistes ou inhibiteurs) | (Honore et al. 2009; Kaan et al. 2010; Miao et al. 2010) |
| Récepteurs Activés par les Protéases | PAR2 | Pharmacologique et génétique | (Lam et al. 2010 ; Lam et al. 2012) |
| Ephrines | Récepteur EphB1 | Pharmacologique (bloqueur) | (Dong et al. 2011) |

Tableau 7. Principales avenues thérapeutiques étudiées à l'aide des différents modèles animaux de douleur cancéreuse.

Plusieurs approches de type pharmacologique ont été testées chez les rongeurs, particulièrement visant le système opioïdérique. Les effets bénéfiques que cette classe de médicaments peut avoir ont été démontrés à plusieurs reprises à l'aide d'agonistes plus ou

moins sélectifs pour le récepteur Mu tels que la morphine (Luger et al. 2002), l'oxycodone (Kato et al. 2008) et le fentanyl (Mouedden and Meert 2007b). Dans tous les cas, il a été possible de renverser au moins partiellement la douleur cancéreuse. Par contre, certaines études ont montré que les doses nécessaires pour le soulagement de cette douleur étaient jusqu'à 10 fois plus élevées que celles utilisées dans un modèle de douleur inflammatoire (Luger et al. 2002). Étant donné les effets secondaires des opiacés, ces doses ne sont pas envisageables chez l'humain et les patients se retrouvent avec un soulagement insatisfaisant (Kirou-Mauro et al. 2009). De plus, une étude utilisant l'infusion chronique de morphine a montré une accélération de la résorption osseuse chez les animaux en raison de l'augmentation de la prolifération des ostéoclastes via le récepteur Mu (King et al. 2007). Ce phénomène a aussi été observé cliniquement grâce à de vastes études statistiques (Vestergaard et al., 2006 ; 2012). Cependant, le retour à une locomotion normale en présence d'un os affaibli était alors tenu responsable de la survenue des fractures chez ces patients. Le mystère plane toujours au sujet de l'effet des anti-inflammatoires non stéroïdiens alors que certaines études montrent l'inefficacité de l'inhibition de COX-2 (Medhurst et al. 2002) alors que d'autres études utilisant des inhibiteurs différents montrent des résultats opposés (Fox et al. 2004). C'est pour cela que d'autres avenues sont évaluées à l'aide des modèles murins. Par exemple, les cannabinoïdes ont soulevé beaucoup d'intérêt depuis quelques années. En effet, le développement d'agonistes visant les récepteurs CB1 et CB2 sont efficaces pour renverser l'allodynie et l'hyperalgésie thermique dans plusieurs études (Khasabova et al. 2008; Hald et al. 2008). Il a même été avancé que les cannabinoïdes pourraient exercer des effets intéressants sur la résorption osseuse chez la souris (Lozano-Ondoua et al. 2010). La douleur cancéreuse peut aussi être freinée de façon indirecte en jouant avec d'autre processus aggravant la douleur. En effet, le fait de ralentir la résorption osseuse contribue à diminuer l'intensité de la douleur et à ralentir son développement. C'est ainsi que des bisphosphonates tels que l'ibandronate, le zoledronate et l'alendronate, utilisés pour freiner l'ostéoporose et les métastases osseuses se sont avérés très utiles dans le traitement de la douleur, seuls ou en combinaison avec d'autres thérapies (Walker et al. 2002; Sevcik et al. 2004; Hald, Hansen, et al. 2009). Les inhibiteurs de la voie RANKL ont aussi le même effet (Roudier, Bain, and Dougall 2006). D'autres avenues très prometteuses impliquant les récepteurs TRPV1 et P2X3 sont

actuellement à l'étude (Honore et al. 2009; Kaan et al. 2010). Quoi qu'il en soit, il y a encore beaucoup de place pour l'amélioration des traitements analgésiques pour la douleur cancéreuse. Il est particulièrement intéressant d'évaluer des options passant par des voies différentes des opioïdes. Cette classe de médicament n'est donc pas à exclure, puisqu'elle demeure la plus efficace. Mais les opiacés pourraient être supportés par une approche complémentaire. C'est pourquoi nous nous intéressons à la neurotensine.

11. Neurotensine.

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 acides aminés qui a d'abord été extrait de l'hypothalamus bovin (Carraway and Leeman 1973). D'abord connu pour ses propriétés hypotensives, il est rapidement apparu que la NT pouvait aussi exercer des effets sur une grande quantité de processus physiologiques associés à sa localisation. D'abord, la NT est fortement exprimée au niveau de l'intestin (Mustain, Rychahou, and Evers 2011). Dans l'estomac et le petit intestin, elle exerce un effet inhibiteur sur la motilité alors qu'au niveau du colon, la motilité est plutôt stimulée par la NT. Son effet sur la contraction des muscles lisses dans le système gastro-intestinal est aussi variable en fonction de la région. Finalement, la NT aurait un effet prolifératif sur les cellules de la muqueuse intestinale et stimulerait la production de COX-2 et PGE-2 dans ces cellules. C'est pourquoi elle est associée à l'inflammation dans cet organe.

La neurotensine est aussi exprimée de façon importante dans le système nerveux central. Les principaux effets exercés par la neurotensine via différentes structures du CNS sont l'antinociception, l'hypothermie, la modulation du système dopaminergique et la stimulation de la sécrétion des hormones hypophysaires (Tyler-McMahon, Boules, and Richelson 2000). Étant donné que l'antinociception est un des sujets principaux de cette thèse. Je m'y attarderai particulièrement dans la prochaine section.

12. Neurotensine et douleur.

Les premières démonstrations de l'effet analgésique de la neurotensine ont été effectuées via une injection intracérébroventriculaire ou intracisternale de neurotensine (Clineschmidt and McGuffin 1977; Nemeroff et al. 1979). Par la suite, l'injection de NT dans différentes structures du cerveau a aussi produit un effet analgésique important (Clineschmidt, Martin, and Veber 1982; Kalivas et al. 1982; Fang, Moreau, and Fields 1987). Déjà à cette époque, l'analgésie neurotensinergique était démontrée comme étant indépendante des opiacés (Clineschmidt, McGuffin, and Bunting 1979). En effet, une injection préalable de naloxone n'empêchait pas l'action analgésique de la NT. L'élucidation du mécanisme d'action de la NT a débuté avec la première preuve que l'effet comportemental observé n'était pas le résultat des effets hypothermiques ou locomoteurs, mais bien d'un effet analgésique (Hylden and Wilcox 1983). L'action antidouleur de la NT s'explique aussi par sa localisation dans le système nerveux central. Des neurones exprimant la neurotensine se trouvent en effet dans plusieurs structures du système nerveux associées au contrôle de la douleur telles que la substance grise périaqueducale (PAG) (Behbehani, Shipley, and McLean 1987) le noyau Raphe Magnus (Urban and Smith 1993), la substance grise de la moelle épinière et l'amygdale (Uhl, Kuhar, and Snyder 1977) et de plusieurs régions du cerveau, dont le cortex.

Le mécanisme d'action de l'analgésie neurotensinergique passe principalement par deux récepteurs couplés aux protéines G, NTS1 (Tanaka, Masu, and Nakanishi 1990; Vincent 1992) et NTS2 (Mazella et al. 1996) (Figure 12).

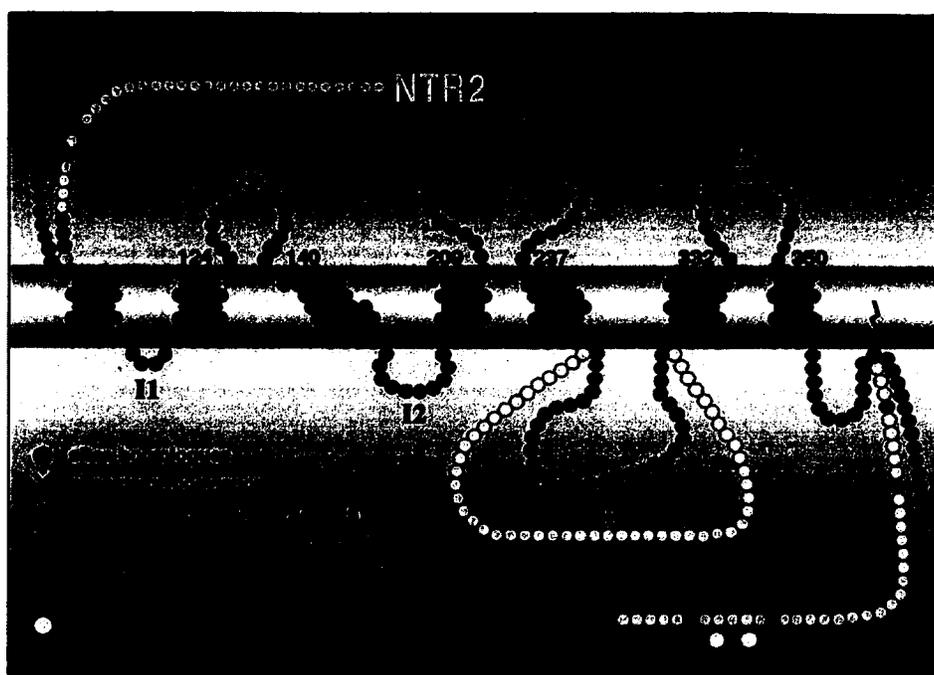


Figure 12. Structure bidimensionnelle des récepteurs NTS1 et NTS2 avec mise en évidence des homologies de séquence entre les deux récepteurs. Extrait de (Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999)

Le récepteur NTS1 joue un rôle dans l'analgésie neurotensinergique puisqu'un antagoniste sélectif pour ce récepteur, le SR48692, diminuent les effets de la NT (Dubuc et al. 1994; D. J. Smith et al. 1997) en douleur aiguë (test du retrait de la queue). De plus, une injection dans le tronc cérébral d'un agoniste sélectif du récepteur, le PD149163, a provoqué une analgésie chez la souris. Cette analgésie a aussi été renversée par le SR48692 (Buhler et al. 2005). En douleur tonique, les effets de l'activation de NTS1 ont été caractérisés récemment dans notre laboratoire. L'injection intrathécale de PD149163 inhibe la douleur induite par une injection intra-plantaire de formaline (Roussy et al. 2008) (Figure 13a). Finalement, cet agoniste NTS1 est aussi efficace dans un modèle de douleur neuropathique chronique (Guillemette et al. 2012). L'administration de l'agoniste renverse partiellement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique ressenties par l'animal suite à une ligature du nerf sciatique (Figure 13b).

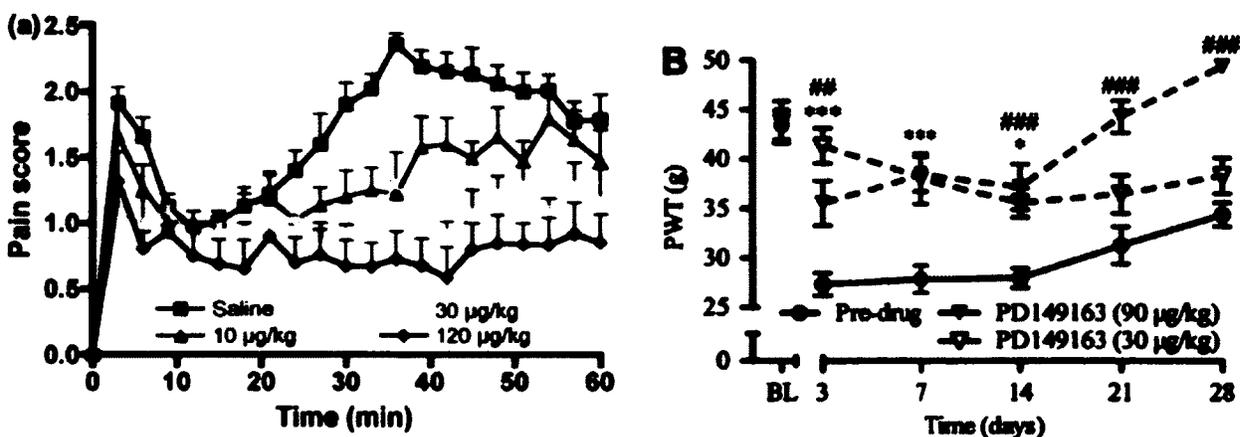


Figure 13. Effet analgésique d'une injection intrathécale de PD149163, un agoniste sélectif du récepteur NTS1, dans un modèle de douleur tonique inflammatoire (A) et dans un modèle de douleur chronique neuropathique (B). L'analgésie dose-dépendante induite par l'agoniste est particulièrement évidente dans la phase inflammatoire (20 à 60 min) du test à la formaline. En douleur neuropathique, la dose la plus forte utilisée arrive à renverser l'allodynie mécanique à tous les jours de test. Extraits de (Roussy et al. 2008) et (Guillemette et al. 2012).

Le récepteur NTS2 a été cloné en 1996 (Mazella et al. 1996). Malgré que sa signalisation intracellulaire soit moins bien comprise que pour NTS1, son rôle dans l'analgésie neurotensinergique est assez bien connu grâce à l'existence d'agonistes sélectifs pour ce récepteur. En effet, une injection intracérébroventriculaire de lévocabastine (sélectif NTS2) diminue la douleur viscérale chez la souris (Dubuc, Remande, and Costentin 1999). De plus, l'analgésie induite par la NT n'est que partiellement conservée lorsque les souris sont invalidées pour NTS2 (Dubuc et al. 1999; Remaury et al. 2002). Finalement, une injection intrathécale de JMV-431 (Figure 14A) provoque une analgésie dose-dépendante au test du retrait de la queue (Sarret et al. 2005). Preuve de sa sélectivité, cet agoniste perd totalement son effet lorsqu'un traitement avec des DsiRNA dirigés contre le récepteur est administré 48 heures avant les tests (Doré-Savard et al. 2008). En douleur tonique (Figure 14B), ce même agoniste induit une robuste analgésie dans le test à la formaline (Roussy et al. 2009). Fait intéressant, les animaux réduisent de façon importante leurs comportements spinaux tels que le soulèvement de la patte alors que les comportements supra-spinaux tels que le léchage et le mordillage sont conservés. L'équipe de Richelson a récemment publié une étude portant sur un nouvel agoniste NTS2, le NT79. Le NT79 a réduit de façon significative la douleur viscérale et la douleur thermique suite à une injection intrapéritonéale. Il s'agirait donc de la première étude démontrant les effets analgésiques

de l'activation de NTS2 en périphérie. De plus, le NT79 montre un effet synergique avec la morphine lorsqu'ils sont co-administrés dans un modèle de douleur tonique (Boules et al. 2011). NTS2 joue donc un rôle dans la modulation de la douleur au niveau spinal mais aussi au niveau des voies inhibitrices descendantes. En effet, l'analgésie induite par la stress est compromise chez les souris KO pour NTS2 et l'administration d'un antagoniste réduit cette analgésie chez les souris soumises à une nage forcée (Lafrance et al. 2010). De plus, l'injection intrathécale de JMV-431 potentialise l'effet analgésique lié au stress, démontrant l'implication de NTS2 dans ce phénomène. De nombreuses études dans notre laboratoire (et possiblement ailleurs), sont en cours afin d'évaluer le potentiel analgésique du récepteur NTS2 dans des modèles de douleur chronique.

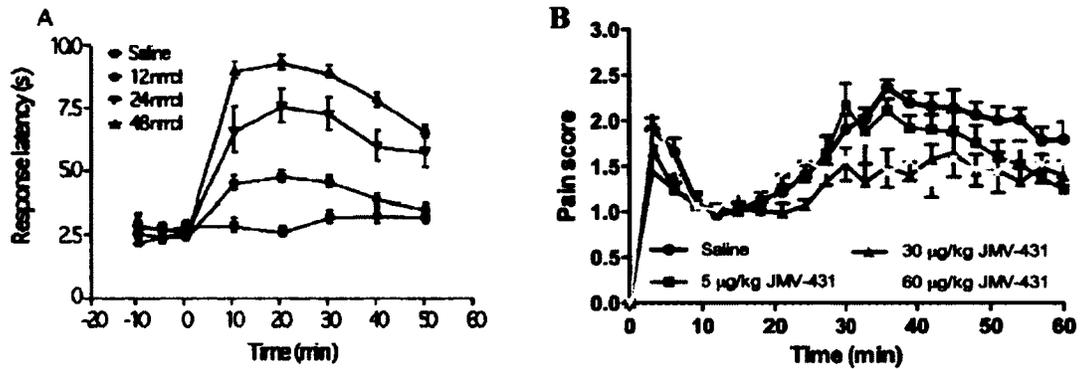


Figure 14. Effet analgésique de l'agoniste sélectif NTS2 JMV-431 injecté par voie intrathécale dans un modèle de douleur aiguë (A) et dans un modèle de douleur tonique (B). A) une analgésie dose-dépendant est observée dans le test du retrait de la queue (52°C). Cette analgésie se poursuit pendant plus de 60 minutes suite à l'injection. B) Un effet analgésique important est observé dans le test à la formaline, particulièrement dans la phase inflammatoire, aux doses de 30 et 60 µg/kg intrathécale.

13. Neurotensine et cancer

Les données provenant de la littérature convergent vers un rôle pour la neurotensine dans le développement de certains cancers (Dupouy et al. 2011). La presque totalité des études réalisées sur le sujet mettent en scène le récepteur NTS1. En effet, des études cliniques suggèrent que l'expression de NTS1 pourrait être corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, du poumon et de la tête (Dupouy et al. 2009; Alifano et al. 2010). Ce constat trouve ses échos en recherche fondamentale alors que plusieurs composantes de la signalisation intracellulaire de NTS1 (Figure 14) sont associées à la prolifération et la migration/invasion des cellules cancéreuses. Son effet pro-inflammatoire dans les intestins serait aussi un facteur aggravant dans les cancers du tube digestif (D. Zhao and Pothoulakis 2006).

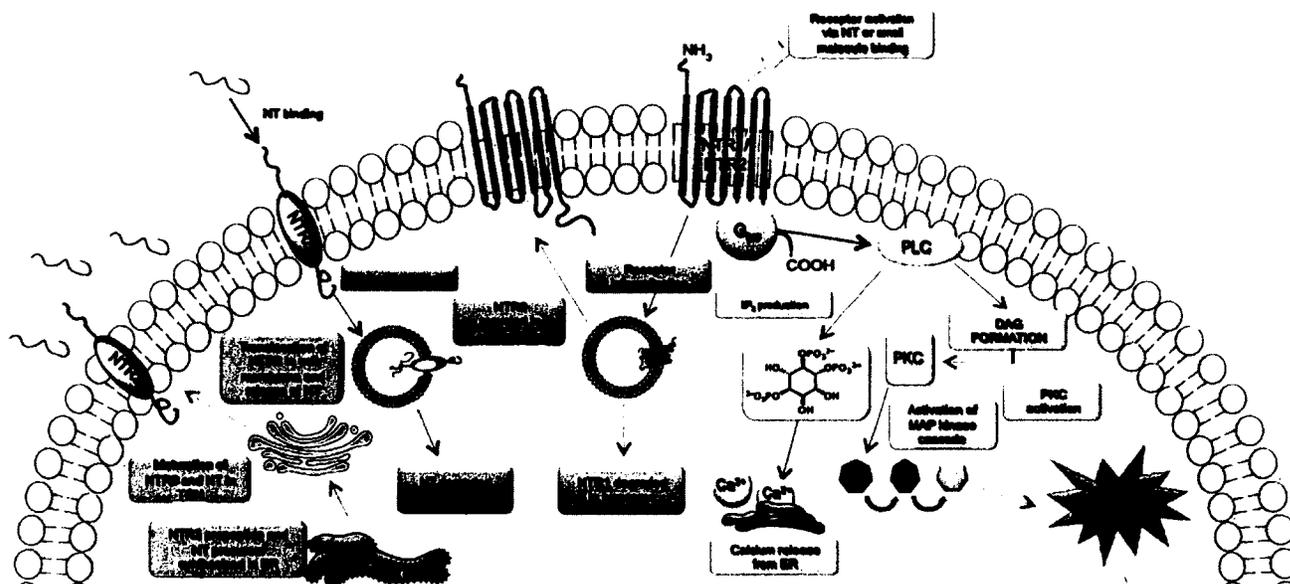


Figure 15. Résumé schématique de la signalisation neurotensinergique via le récepteur NTS1. Extrait de (Myers et al. 2009).

Fait intéressant, la surexpression de NTS1 dans les tissus cancéreux stimule le développement d'outils d'imagerie moléculaire ciblant ce récepteur (Myers et al. 2009).

La neurotensine semble donc être un médiateur important dans la modulation de la nociception et un acteur agissant dans plusieurs composantes de la biologie de certains cancers. La combinaison de ces effets en fait donc une option thérapeutique en cancer des os qui selon nous mériterait une étude plus poussée. C'est donc en ce sens qu'est orientée une partie de nos objectifs décrits à la page suivante.

Hypothèse et objectifs des études réalisées.

Étant donné l'apport important des modèles animaux dans notre compréhension de la douleur cancéreuse et l'importance de l'imagerie médicale dans la détection des métastases et le suivi des traitements, notre hypothèse générale est que :

- La caractérisation d'un meilleur modèle de douleur cancéreuse à l'aide d'outils innovants d'imagerie améliorera nos connaissances sur le lien entre la douleur et les métastases osseuses afin de mieux évaluer des traitements analgésiques potentiels..

Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes donnés pour objectifs:

1. D'élaborer et de caractériser un nouveau modèle de douleur cancéreuse chez le rat qui se rapproche de la réalité clinique.
2. De mettre en lien l'intensité de la douleur cancéreuse aux événements pathologiques (apparition de la tumeur, résorption osseuse) nécessaires au développement de celle-ci.
3. De se doter d'outils innovants d'imagerie médicale afin de caractériser, en plus du développement de la douleur, le développement de la tumeur dans l'os et la résorption osseuse induite par une tumeur lytique.
4. D'examiner le potentiel analgésique des analogues neurotensinergiques dans le soulagement de la douleur cancéreuse dans notre modèle.

Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain

Auteurs de l'article : Louis Doré-Savard, Valérie Otis, Karine Belleville, Myriam Lemire, Mélanie Archambault, Luc Tremblay, Jean-François Beaudoin, Nicolas Beaudet, Roger Lecomte, Martin Lepage, Louis Gendron et Philippe Sarret.

Statut de l'article : Publié dans le journal PLoS ONE 5 (10) , art. no. e13774

Avant-propos : Cet article fait la présentation de notre modèle de douleur cancéreuse. Il s'agit d'une vaste étude de caractérisation faisant état des qualités du modèle au niveau comportemental, anatomique et histologique. J'ai d'abord participé très activement à la création du modèle en mettant au point la présente version de la procédure chirurgicale. J'ai effectué toutes les expériences de comportement et d'imagerie présentées dans cet article. J'ai participé activement à la réalisation et à l'analyse des expériences d'histologie. J'ai aussi participé de façon majoritaire à l'écriture du manuscrit à tous les niveaux d'avancement de l'article.

Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain

Le développement de meilleurs traitements utilisés en clinique est favorisé par une évaluation préclinique dans des modèles animaux pertinents calqués sur la réalité clinique. Dans cette optique, nous proposons dans cette étude de faire un pas de plus dans la création d'outils pertinents pour l'évaluation et le suivi d'une condition qui tarde à trouver un traitement adéquat chez les patients : la douleur associée au cancer des os. Notre modèle murin de douleur cancéreuse utilise l'injection de cellules de carcinome mammaire MRMT-1 afin de mimer l'implantation d'une métastase osseuse au niveau du fémur. L'apparition et la progression de la douleur ont été mesurées à l'aide de trois tests comportementaux. L'allodynie et l'hyperalgésie mécanique ont fait leur apparition au jour 14, tout comme un changement dans l'utilisation de la patte atteinte peut être observée à l'aide du test de distribution pondérale dynamique à ce stade. Par la suite, nous avons effectué une évaluation radiologique et histologique de la situation au niveau de l'os. Des signes d'ostéopénie sont visibles au jour 14 alors que l'envahissement complet du canal médullaire est visible au jour 21. Nous avons aussi intégré des outils d'imagerie minimalement invasive afin de proposer des méthodes de détection et de suivi qui pourraient améliorer la prise en charge de la douleur, mais aussi du cancer. L'imagerie par résonance magnétique nous a permis de détecter la présence d'une tumeur dès le jour 8 post-implantation, soit bien avant l'apparition de la douleur. En effet, nous avons constaté que la douleur apparaissait (et devenait plus intense) lorsque la tumeur dégradait l'os de manière plus importante. Ce processus de résorption osseuse a aussi été caractérisé à l'aide de la tomодensitométrie osseuse (μ CT) et la tomographie d'émission par positrons (TEP). En μ CT, le ratio BV/TV diminue de façon importante à partir du jour 14 autant pour l'os trabéculaire que pour l'os compact (cortical). De plus, l'injection du traceur visualisable en TEP 18F-NaF a montré une activité métabolique (bone turnover) très importante au niveau du front de progression de la tumeur. La douleur osseuse a aussi été associée à des modifications neurochimiques dans les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière et dans la moelle épinière elle-même. Nous avons observé une augmentation de

l'expression des marqueurs d'activité neuronale c-fos et ATF-3 ainsi que de l'activité des cellules astrocytaires (GFAP) et microgliales (Iba1).

Behavioral, Medical Imaging and Histopathological Features of a New Rat Model of Bone Cancer Pain

Louis Doré-Savard¹, Valérie Otis¹, Karine Belleville¹, Myriam Lemire¹ Mélanie Archambault², Luc Tremblay², Jean-François Beaudoin², Nicolas Beaudet¹, Roger Lecomte², Martin Lepage², Louis Gendron¹ and Philippe Sarret^{1,*}

¹Department of Physiology and Biophysics;

²Department of Nuclear Medicine and Radiobiology and Centre d'Imagerie Moléculaire de Sherbrooke;

Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

Number of text pages: **52**

Number of figures: **7**

Number of supplemental figures: **1**

Number of words in abstract: **215**

Number of tables: **1**

*** Corresponding author:**

Philippe Sarret, PhD
Department of Physiology and Biophysics
Faculty of Medicine and Health Sciences,
Université de Sherbrooke
3001, 12^e Avenue Nord
Sherbrooke, Quebec, J1H 5N4
Canada
Tel: (819) 820-6868, ext: 12554
Fax: (819) 820-6887
Email: Philippe.Sarret@USherbrooke.ca

Key words: Analgesia, femur, MRMT-1, MRI, μ CT, PET, TRAP, GFAP, Iba1, dynamic weight-bearing

Acknowledgements:

We thank Dr. George Wilcox for his revision of the manuscript and relevant suggestions. We thank Drs. Pelmus and Mongeau from the Service of Pathology of the CHUS for their contribution to the histological analysis. We also thank Yonjung Xiao for the μ CT analyses of our bone samples. We thank Nathalie Carrier from the Centre de Recherche Clinique Étienne-Lebel for her revision of the statistical analyses performed.

Abstract

Pre-clinical bone cancer pain models mimicking the human condition are required to respond to clinical realities. Breast or prostate cancer patients coping with bone metastases experience intractable pain, which affects their quality of life. Advanced monitoring is thus required to clarify bone cancer pain mechanisms and refine treatments. In our model of rat femoral mammary carcinoma MRMT-1 cell implantation, pain onset and tumor growth were monitored for 21 days. The surgical procedure performed without arthrotomy allowed recording of incidental pain in free-moving rats. Along with the gradual development of mechanical allodynia and hyperalgesia, behavioral signs of ambulatory pain were detected at day 14 by using a dynamic weight-bearing apparatus. Osteopenia was revealed from day 14 concomitantly with disorganization of the trabecular architecture (μ CT). Bone metastases were visualized as early as day 8 by MRI (T_1 -Gd-DTPA) before pain detection. PET ($Na^{18}F$) co-registration revealed intra-osseous activity, as determined by anatomical superimposition over MRI in accordance with osteoclastic hyperactivity (TRAP staining). Pain and bone destruction were aggravated with time. Bone remodeling was accompanied by c-Fos (spinal) and ATF3 (DRG) neuronal activation, sustained by astrocyte (GFAP) and microglia (Iba1) reactivity in lumbar spinal cord. Our animal model demonstrates the importance of simultaneously recording pain and tumor progression and will allow us to better characterize therapeutic strategies in the future.

Introduction

Among cancers with a poor prognosis, those originating from breast, lung and prostate commonly metastasize to the skeleton[1,2]. While primary bone cancers are rare, over 70% of people coping with advanced breast or prostate cancer will develop bone metastases[3]. The major factor responsible for the decrease in quality of life in bone metastases-bearing patients is pain[4].

Bone cancer pain originates from nerve compression, ischemia and release of proinflammatory substances by the tumor and cells from the bone environment[5]. Thus, lytic cancer cells affect bone homeostasis through the release of cytokines promoting pathological resorption by osteoclasts[6,7]. In addition to bone destruction[8], osteoclast hyperactivity creates an acidic environment responsible for the accommodation of pain [9]. Compensative and anarchic bone formation by osteoblasts compresses free nerve terminal endings scattered in the bone marrow, matrix and periosteum[10], leading to the genesis and maintenance of pain. The association of those phenomena produces a unique mechanical and neurochemical onset that goes beyond the combination of neuropathic and inflammatory pain[11].

Bone cancer pain's unique characteristics make it therapeutically intractable[11]. Indeed, typical approaches including anti-inflammatory drugs and opiates have limited relief efficiency[12]. Due to its progressive nature, escalating doses are required to adequately alleviate bone cancer pain[13], leading to side effects and ultimately to abortive compliance[4,14]. Moreover, morphine was recently proven to accelerate cancer-induced bone loss in osteolytic cancers[15,16]. Similarly, promising anti-resorptive bisphosphonate therapies[17,18,19,20,21], shown to slow cancer progression and indirectly alleviate pain, were shaded by comorbid osteonecrosis[22]. Bone cancer pain thus remains a concern, highlighting the need to accentuate our understanding of its neurobiological mechanisms in order to develop more effective strategies.

Animal models were elaborated to mimic the human condition in an attempt to understand bone cancer pain. Mouse models of calcaneus and humerus cancer[23], or rat models of tibia cancer with mammary MRMT-1[24], 4T.1[25] and Walker 256[26], or prostatic AT-3.1[27] cells were developed to characterize local changes or neural plasticity of spinal structures projecting to the bone. From a clinical point of view, the femur, however, represents the most frequently affected long bone[28]. Mouse femoral models involving intramedullary implantation of fibroblast cancer cell lines to induce pain are reported (e.g. fibrosarcoma[29,30]). However, those models are based on mimicking primary bone cancers. The majority of secondary bone cancers originate from breast or prostate cancers, known for their bone-metastasizing properties[31]. Yet, for models involving those types of cells, induction is either intravenous (leading to multiple site metastases[32,33]) or follows a surgical procedure in which a patellar arthrotomy and partial alteration of the knee joint are susceptible to impaired locomotion, which in turn biases the evaluation of pain-related behavior. Indeed, invasiveness and surgical procedures need to remain minimal in order to assess breakthrough pain without interference. This latter pain manifestation is the most refractory condition to overcome for individuals coping with chronic cancer pain and among the toughest to evaluate in animal models.

In addition to pain assessment, the means to detect and monitor bone pathologies have evolved to incorporate X-ray micro-computed tomodensitometry (μ CT) and bone scintigraphy[34]. Nonetheless, preventive determination of tumor nesting and progression has the potential to improve analgesic posologies and to limit bone remodeling. Advanced non-invasive and low radiation medical imaging, such as positron emission tomography (PET) and magnetic resonance imaging (MRI) or the combination of both, would be desirable to enable efficient and repeated exams for accurate and rigorous analgesic therapy adjustments[35].

The rat remains the most studied species in pain paradigms[36]. We therefore selected a rat mammary carcinoma cell line for its spontaneously metastasizing and transplantable properties. The capability of MRMT-1 to metastasize to remote organs is intrinsic to those

syngeneic cells[37]. In the present study, we describe an intervention in the Sprague-Dawley rat femur to implant breast tumor cells using a light surgical procedure in an effort to mimic clinical pain. We utilized a combination of innovative behavioral and medical imaging approaches, supported by immunohistochemical and pathological observations, to characterize the model. The study aims at improving clinical relevance with regard to the model and tools used to screen new lead compounds, in order to characterize bone tumor progression as well as to elucidate the mechanisms underlying the genesis and maintenance of bone cancer pain.

Methods

Cell culture

Mammary rat metastasis tumor (MRMT-1) cells (carcinoma) were kindly provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University 4-1, Seiryō, Aoba-ku, Sendai, Japan) and harvested in RPMI 1640 medium (Gibco, Montreal, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (heat-inactivated) and 2% penicillin/streptavidin (Gibco, Montreal, Qc, Canada). Cells were detached by brief exposure to 0.25% w/v trypsin-EDTA (Gibco, Montreal, Qc, Canada) and prepared for injections. Briefly, cells were pelleted by centrifugation (3 min. at 200 X g), rinsed with 1 ml of Hank's balanced salt solution exempt of calcium, magnesium or phenol (HBSS; Gibco, Montreal, Qc, Canada) and further centrifuged in the same conditions. The pellet was re-suspended in 1 ml of HBSS, and cells were counted with a hemocytometer. Cells were diluted to achieve a final concentration for injection of 30000 cells in 20 µl and maintained on ice prior to surgery.

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats (200-225 g; Charles River Laboratories, St.-Constant, Quebec, Canada) were maintained on a 12h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Animal-related procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke and carried out according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Rats were acclimatized for 4 days to the animal facility and for 2 days to manipulations and devices prior to behavioral studies. Note that animals tested for pain and used for immunohistochemical analyses were different from those being imaged by MRI or MRI-PET, since prolonged anesthesia can affect behavioral responses.

Surgery

After complete anesthesia with 5% isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, Qc, Canada), rats were laid in the supine position and their right paws were shaved and disinfected with 70% v/v ethanol. Anesthesia was maintained with 2.5% isoflurane and the rat eyes were

protected with an ophthalmic liquid gel (Tear-gel, Novartis, Mississauga, ON). A minimal skin incision (8-10 mm) exposed the *quadriceps femoris*. The *vastus lateralis* was incised (5-8 mm in length) to expose the femoral epicondyle, while the patellar ligament remained untouched and minimal damage was inflicted to the surrounding muscle and blood vessels. Using a 0.8 A stereotaxic drill (Foredom, Bethel, CT, USA) connected to a 1.75 mm carbide steel burr (Stoelting Co., WoodDale, IL, USA), a small and superficial cavity was burred between the medial epicondyle and the adductor tubercle (approximately 1 mm in depth). In that cavity, a 25-gauge needle was inserted at a 45° angle, allowing it to reach the intramedullary canal of the femur. The needle was substituted with a blunt-end 25-gauge needle connected to a 50 µl Hamilton syringe containing 20 µl of the cell suspension (cancer group) or of HBSS (sham group). The syringe was left in place for 1 min to allow cell dispersion in the bone marrow. The needle was then removed and the cavity was sealed with dental amalgam (Prodigy A3, Kerr, Orange, CA) and polymerized with a curing light (QHL75, Dentsply, Milford, DE). The site was thoroughly washed with sterile deionized water. The muscle and the conjunctive tissue were closed with a discontinuous suture made with synthetic absorbable sutures (Monocryl, Ethicon, Sommerville, NJ), and the skin was closed with a continuous suture from non-absorbable surgical suture (Prolene, Ethicon, Sommerville, NJ). The wound was finally washed with 3% v/v peroxide and sprayed with a bitter solution (Aventix Animal health, Flamborough, ON).

Behavioral studies

Mechanical allodynia was assessed using a dynamic plantar esthesiometer (Ugo Basile, Stoelting, IL, USA), an automated version of the von Frey hair. Animals were placed in enclosures on an elevated wire mesh and responses to punctate mechanical stimulation were assessed using the esthesiometer. A straight metal filament (0.5 mm diameter) was orientated beneath the pad until it touched the plantar surface of the hind paw and began to exert an upward force. The force required to elicit a withdrawal response was measured in grams and automatically registered when the paw was withdrawn or the preset cut-off was reached (50 g). Five values were taken alternately on both ipsilateral (operated side) and contralateral hind paws at intervals of 15 s.

Mechanical nociceptive withdrawal responses were measured using an analgesiameter (Ugo Basile, Stoelting, IL, USA) that applies a linearly increasing pressure (16 g/s) via an acrylic stylus. The stylus was placed over the medial dorsum of the hind paw, between the 1st and 2nd tarsometatarsal joints and the mean of four consecutive measures beginning with the left or right hind paw, alternately, was recorded as the withdrawal threshold in grams. The cut-off was set to 200 g. Comparison for each testing day was performed by subtracting the ipsilateral weight (g) from the contralateral weight value (g) to determine the paw withdrawal threshold (PWT) difference.

Static weight bearing was measured using the Incapitance Meter (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). The animal was positioned with the hind limbs at rest on the two weight-averaging platform pads. The unit recorded the average weight put on each pad over a 2 s period. The measurement was repeated 3 times. The results obtained with the incapitance meter were used as a control for a second weight-bearing test, the Dynamic Weight Bearing test (Bioseb, Boulogne, France). The device consisted of a bottomless Plexiglas enclosure (25 × 25 × 24 cm³) and a sensor (1936 single captors). The sensor was placed on the floor of the enclosure, covering its entire surface. The rat was allowed to move freely within the apparatus for 5 min and the weight-bearing information was transmitted live to a laptop computer via an USB interface. The raw data were analyzed with DWB 1.1.0.6 software (Bioseb). A paw was detected when one captor recorded a weight of at least 4 g and a minimum of 2 adjacent captors recorded a weight of at least 1 g. The paw had to be stable for a minimum of 0.5 s to be included. Using a synchronized video-recording of the test and the scaled map of the detected zones, each presumed paw was validated by an observer and identified as a left or right and fore or hind paw. Other zones detected, representing the tail or another body part, were also included in the analysis.

The effect of subcutaneous morphine was evaluated on days 11, 14, 18 and 21 in our model. Morphine-sulphate stock solution (50mg/ml) was diluted in sterile saline to achieve injection concentration (3mg/ml). Rats were than injected s.c. with 3 mg/kg (1µl/g) and

returned to their cage. Behavioral tests were performed 30 minutes after the injection as described earlier.

Immunohistochemistry

Rats were deeply anaesthetized with 5% isoflurane and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) were post-fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde and then transferred to 30% sucrose (48 h) for cryoprotection. Serial frozen spinal cord sections, 35 μm thick, were cut using a sliding microtome, collected in PBS and processed as free-floating sections. Frozen DRG were embedded in OCT Tissue-Tek, cut on a cryostat at a thickness of 12 μm , collected and processed on slides.

Tissue sections were incubated for 60 min at room temperature in a blocking solution of 5% normal goat serum in PBS with 0.5% Triton X-100 and 2% albumin and then incubated for 30 min in 0.1 M glycine solution to reduce autofluorescence. The sections were then incubated with the primary antiserum overnight at 4°C. Spinal cord sections were immunostained with antibodies against markers of microglia, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1, polyclonal antibody rabbit anti-Iba1, 1:1000, Wako, Richmond, VA, USA), astrocytes, glial fibrillary acidic protein (GFAP, monoclonal clone GA5 mouse anti-GFAP, 1:500, Sigma, Oakville, Ontario, Canada) and c-Fos protein (c-Fos, polyclonal rabbit anti-Fos, 1:20 000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) and in DRG against activating transcription factor 3 (ATF-3 (C-19), polyclonal rabbit anti-ATF-3, 1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). After incubation, tissue sections were washed two times for 10 min in PBS and incubated in the secondary antibody solution for 2 h at room temperature. Secondary antibodies conjugated to fluorescent markers Alexa Fluor® 488 and Alexa Fluor 647® were used at 1:500 (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Sections were then mounted with Aquamount. The absence of cross-reactivity among the secondary antibodies was verified by omitting primary antibody during the overnight incubation.

Fos protein and ATF-3 factor were also detected by immunohistochemistry, using the avidin-biotin-peroxidase method. The DRG slides and spinal cord sections were treated

with 0.5% hydrogen peroxide for 30 min to inhibit endogenous peroxidase activity and incubated for 30 min in a blocking solution of 5% normal goat serum, 2% albumin, and 0.5% Triton X-100 in PBS. The sections were then incubated overnight at 4°C in the primary c-Fos (spinal cord) and ATF-3 (DRG) antibodies, which were diluted in 1% NGS with 0.1% Triton X-100. After incubation, the sections were rinsed and blocked with 3% NGS for 15 min and incubated for 2 h in the secondary antibody, biotinylated goat anti-rabbit IgG (goat anti-rabbit H+L, 1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), followed by streptavidin-horseradish peroxidase with the avidin-biotin method for 1 h (Horseradish Peroxidase Streptavidin, PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at room temperature. Sections were then incubated for 3 min with 0.02% diaminobenzidine with 0.01 % hydrogen peroxide, then dehydrated and coverslipped with Permount® Mounting Media (SP15-500, Fisher Scientific, NY, USA).

Quantification

Using an Olympus Confocal Imaging microscope and Olympus Fluoview FV1000 software, sections from the lumbar spinal cord were taken with identical acquisition parameters (gain, exposure time) and analyzed by confocal microscopy to characterize immunofluorescence (IF). Epifluorescence and bright-field pictures were taken by a Leica DM4000 microscope equipped with a Leica DFC350FX and an InfinityX camera for immunofluorescence.

Fos-immunoreactive nuclei were counted when having small, rounded or ovoid, dark staining, in comparison to control. Laminae delimitation was performed with a rat spinal cord histo-architecture template[38], in accordance with lumbar segment L1/L2/L3 of the section. In the present study, c-Fos-immunoreactive cells were counted as combined laminae I-II, III-IV, V-VI, and VII-VIII, respectively. Eight 35- μ m spinal cord sections over the L1/L2/L3 segment of each animal (n=3) were randomly chosen per animal per condition to determine total c-Fos number.

The quantification of ATF-3 positive neurons in DRG 12- μ m-thick sections was carried out by counting the number of neurons with ATF-3 immunoreactive nuclei at 20X magnification, using a Leica DFC350FX microscope. DRGs corresponding to the lumbar spinal cord levels L1/L2/L3 were selected as the main projection sites of primary afferent

fibers innervating the femur[39,40]. Counting of ATF-3 positive cells was performed once in three series, every 36 μm . This count was expressed as mean number of ATF-3 immunoreactive cells per section (n=24). Sham and cancer animals from 3 independent experiments were used for ATF-3 determination.

Glial staining for GFAP and Iba-1 in the L1/L2/L3 spinal cord was quantitatively analyzed by optical density with Image J software version 1.6. Image J was first calibrated with an image from a control animal using the calibrate function. The settings were then conserved for all subsequent analyses. Three randomly selected sections of the spinal cord L1-L3 in each animal (n=3) were analyzed. The optical densities of nine sections (three sections/animal) were averaged to provide a mean number for each condition.

Radiological analysis

Radiographs were performed on dissected bones using a Faxitron MX-20 (Faxitron, Lincolnshire, IL). Pictures were taken at 26 kV, exposure time: 10 s; magnification: 2X. Micro-computed tomography analyses were performed on dissected limbs of tested rats with a 1072 MicroCT system (Skyscan, Kontich, Belgium). The parameters were: source: 80 kV, 124 μA ; zoom: 20X; pixel size: 14.06 μm ; exposure time: 3.0 s; rotation: 0.9°. Bone Volume/Total Volume (BV/TV) determination: cortical + trabecular bone volume (BV) divided by any type of tissue (TV) in the range of 5,626 mm corresponding to 201 cross sections (volume of interest; VOI), starting from the growth plate of the distal femur. Trabecular BV/TV is defined by the trabecular bone volume divided by the TV from the VOI. Analyses were performed with CT Analyser 1.10.0.1 (Skyscan, Kontich, Belgium).

Magnetic Resonance Imaging and Positron Emission Tomography

MRI studies were conducted at the *Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke* with a 210 mm small-animal 7T scanner (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) and a 63 mm volume RF coil. Sprague-Dawley rats were placed in the supine position in an MRI-compatible cradle equipped with a homebuilt paw support designed to position both limbs stably and reproducibly. Animals were anaesthetized with 3% (induction) and 1.5% (stabilization)

isoflurane in oxygen. A feedback-controlled animal warm-air heater system was used to keep the animal's body temperature at physiological levels and the respiration rate was continuously monitored (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA). The MRI protocol included the acquisition of axial (sagittal) pre-contrast and 10 min post-contrast T_1 -weighted images, using a gradient echo sequence with TR: 210 ms, TE: 3.35 ms, flip angle: 30° , matrix: 256×256 , FOV: $60 \times 60 \text{ mm}^2$, NA: 8 (30 sagittal slices), 1.5 mm thick. A 600- μl bolus of contrast agent (Gd-DPTA, Magnevist, Berlex) was injected via the tail vein. Animals were imaged before and 6, 8, 10, 13, 15 and 18 days post-implantation. To evaluate tumor invasiveness, a region of interest (ROI), including the whole bone cortex and medullar channel of the femur, was defined. This ROI yielded a voxel intensity histogram for both hind paws. The contralateral maximal voxel intensities were used to fix the pathological threshold. Every ipsilateral voxel remaining was colored according to its intensity with a yellow-red scale. Matlab Version 7.1 (Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, USA) was used to analyze the data and perform the calculations.

Positron emission tomography was performed using the LabPET4 Sherbrooke with Core Temperature Control. Ring diameter: 162 mm; FOV: 37.5 mm; Cristals: 3072; Spatial resolution: 1.35 mm FWHM FOV; Noise-equivalent counts: 37 kcps at 245 MBq (250-650 keV). Immediately after MRI scans, animals remained under anesthesia in the same position and the cradle was transferred to the PET scanner. The collimator was aligned to the hind knee joints; 9.25 MBq of Na^{18}F was injected i.v. (200 μl at 500 $\mu\text{l}/\text{min}$). The distribution of the radiotracer was monitored over 30 min and double-volume sampling was performed for 30 min. Breathing and body temperature of the animal were monitored at all times throughout the procedure.

Histological analysis and measurement of osteoclast activity

Twenty-one days after tumor injection, rats were euthanized and femora were removed. Femurs were fixed in 4% paraformaldehyde for 72 hours, decalcified in 10% EDTA (pH 7.4) for 2-3 weeks, and finally embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut in 3- or 5- μm -thick sections with a microtome equipped with a carbide blade and slices were stained with Harris' hematoxylin and eosin to determine cancer cell infiltration and bone

destruction. To identify activated osteoclasts, tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) staining was performed. Using the Leukocyte (TRAP) Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States), the slices were exposed to the substrate for 1 hour and staining was visualized with a Leica DM4000B (Leica, Toronto, ON, Canada). In total, 3.5 fields were counted at a magnification of 250X for a total surface of 1 mm². Labeled osteoclasts were counted along the mineralized bone-tumor or the bone-bone marrow interfaces and 4-7 slices were analyzed for each animal, from groups of 4 animals.

Statistical analyses

Von Frey and DWB data were analyzed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test and Randall-Sellitto was analyzed with a Student's *t*-test for comparison of contra- and ipsilateral hind paws for each day. C-Fos, ATF-3 and Iba1/GFAP count differences were determined with a repeated measure ANOVA followed by a Bonferroni multiple-comparison test. Normality was evaluated with Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilks tests. BV/TV graphs were analyzed with a one-way ANOVA and TRAP counts with a Student's *t*-test. $P \leq 0.05$ was considered as the level of statistical significance.

Results

Implantation of breast carcinoma cells in the femur induces touch-evoked and ambulatory pain

In the attempt to mimic clinical bone cancer pain, we performed a local injection of the cells directly in the femur between the medial epicondyle and the adductor tubercle. The impact of surgery was minimized by implantation at this anatomical site, which reduces the chances of patellar ligament or joint damage. Accordingly, as assessed by von Frey and dynamic weight bearing (DWB), sham animals showed no signs of mechanical allodynia or locomotion impairment throughout the behavioral test period (Figs. 1A, C), even in early days following the surgical procedure (data not shown). Cancer-bearing male rats inoculated with 30,000 MRMT-1 cells displayed a decreased withdrawal threshold in the dynamic von Frey test from day 14 (36.7 ± 2.0 g; $p < 0.05$; Fig. 1A). After that, allodynia rapidly progressed until day 21, when it was maximal (23.3 ± 1.5 g, $p < 0.001$). Cancer cells inoculated in the right hind paw did not elicit mechanical allodynia on the contralateral side (Fig. 1A). Concomitantly to allodynia, mechanical hyperalgesia developed progressively in tumor-bearing rats. As measured with the Randall-Selitto test, a significant difference was observed between ipsilateral and contralateral paw withdrawal thresholds from day 18 (30.9 ± 10.8 g, $p < 0.001$) to day 21 (25.7 ± 7.6 g, $p < 0.01$; Fig. 1B). These results demonstrate that measurable touch-evoked pain behaviors develop after the injection of carcinoma cells into the femur, as previously demonstrated with MRMT-1 cell implantation in the tibia[24]. After pain detection on day 14, subcutaneous administration of morphine (3 mg/kg) did not reverse mechanical allodynia induced by tumor progression in cancer-bearing rats (Figure S1).

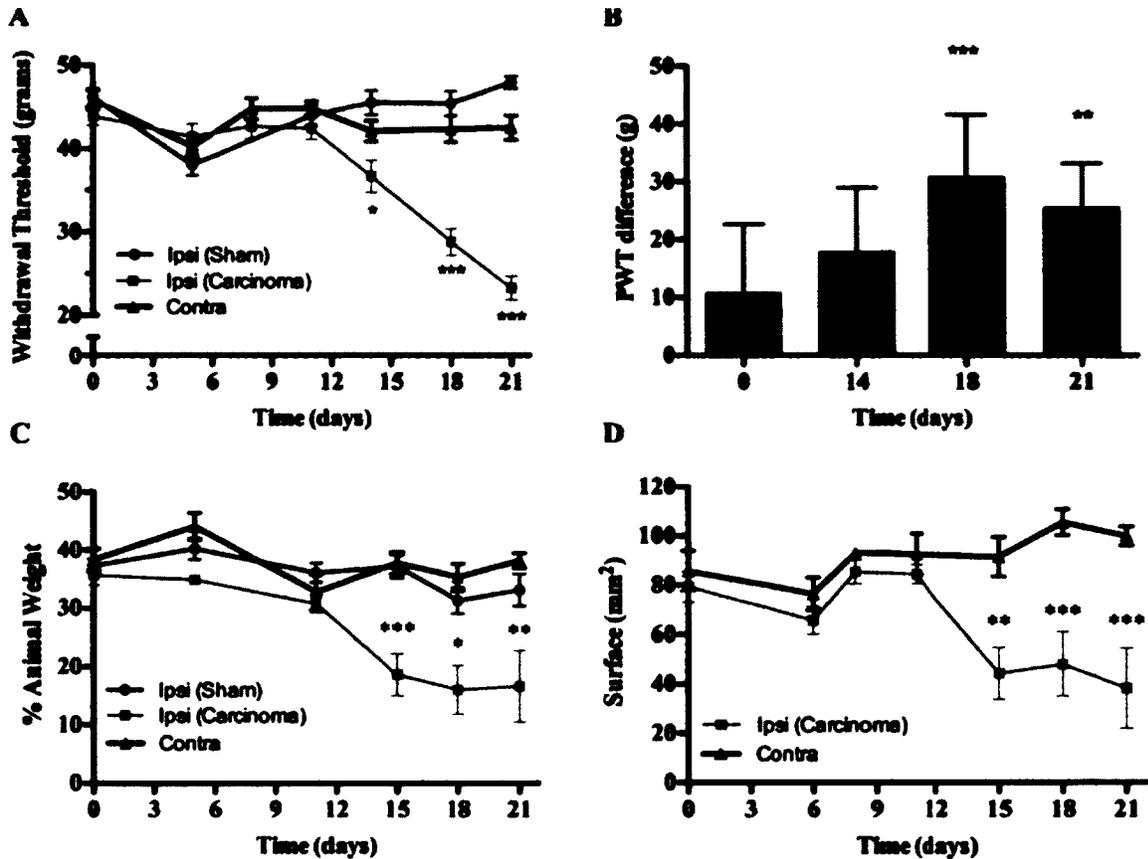


Figure 1. Evaluation of mechanical sustained pain on a 21-day schedule following the implantation of MRMT-1 cells in rat right distal femur metaphyse. (A) Allodynia was determined using the von Frey test following tumor implantation. The withdrawal threshold diminishes progressively from day 11 in response to nociception accommodation in cancer-bearing animals ($n=10$). The contralateral paw remains unaffected, as does the sham-treated ipsilateral limb ($n=10$). **(B)** Evaluation of hyperalgesia was performed using the Randall-Sellitto test. Results are expressed as the paw withdrawal threshold (PWT) difference between the ipsi- and contra-lateral hind paws. Significant hyperalgesia was observed at days 18 and 21 ($n=10$). **(C)** Quantification of dynamic weight-bearing in the implanted animals, expressed as a percentage of animal weight. A significant difference in weight distribution on each paw is observable from day 15. **(D)** Dynamic analysis of the surface of contact between the hind paw and the sensor presents similar results at day 15, 18 and 21 when the ipsi- and contralateral paws are compared in cancer groups ($n=7$ in each group). Data are mean \pm S.E.M, *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$ ***: $p \leq 0.001$.

Limb discomfort was first assessed by static weight-bearing. From day 15, half of the ipsilateral weight was redistributed to the contralateral paw (data not shown). In order to evaluate a representative weight redistribution across the animal's entire body, without restraint, we performed DWB assessments. The kinetics of transfer to the hind paws were

similar to those observed in static bearing, starting around day 12 and increasing until day 21 (Fig. 1C). However, it is noteworthy that weight compensation was mainly made upon body parts other than the contralateral hind paw, such as the tail, bottom abdomen or forepaws. Indeed, at day 21, approximately 50% of the weight was borne elsewhere than the hind paws, in comparison to 33% prior to pain onset (data not shown). Accordingly, the paw surface in contact with the floor was also significantly affected from day 15, as compared to the contralateral paw (Fig. 1D). These pain behaviors mirror the clinical observation of breakthrough pain, which is experienced after the movement of tumor-bearing limbs in bone cancer patients.

Neuronal and glial plasticity in cancer-bearing animals

Metastasis proliferation in the rat femur induces neuronal activation and glial changes throughout afferent fibers projecting to L1-L3 spinal lumbar segments. Fourteen days following MRMT-1 cell implantation, immunohistochemical analyses were performed on spinal cord and DRG tissues to examine the resulting neurochemical alterations. C-Fos and ATF-3 immediate-early genes were used to follow spinal and sensory neuronal activities (Fig. 2 and 3, respectively). First, we observed a repetitive and scattered c-Fos expression pattern in the ipsilateral spinal horn of tumor-injected rats (Fig. 2A). At day 14 post-surgery, an intense increase in the number of c-Fos-immunoreactive neurons was observed towards deeper laminae V-VI and VII-VIII in spinal cord segments L1-L3, as compared to sham animals (Figs. 2B, D). In contrast, C-Fos staining was almost absent in the contralateral side (Figs 2C, E).

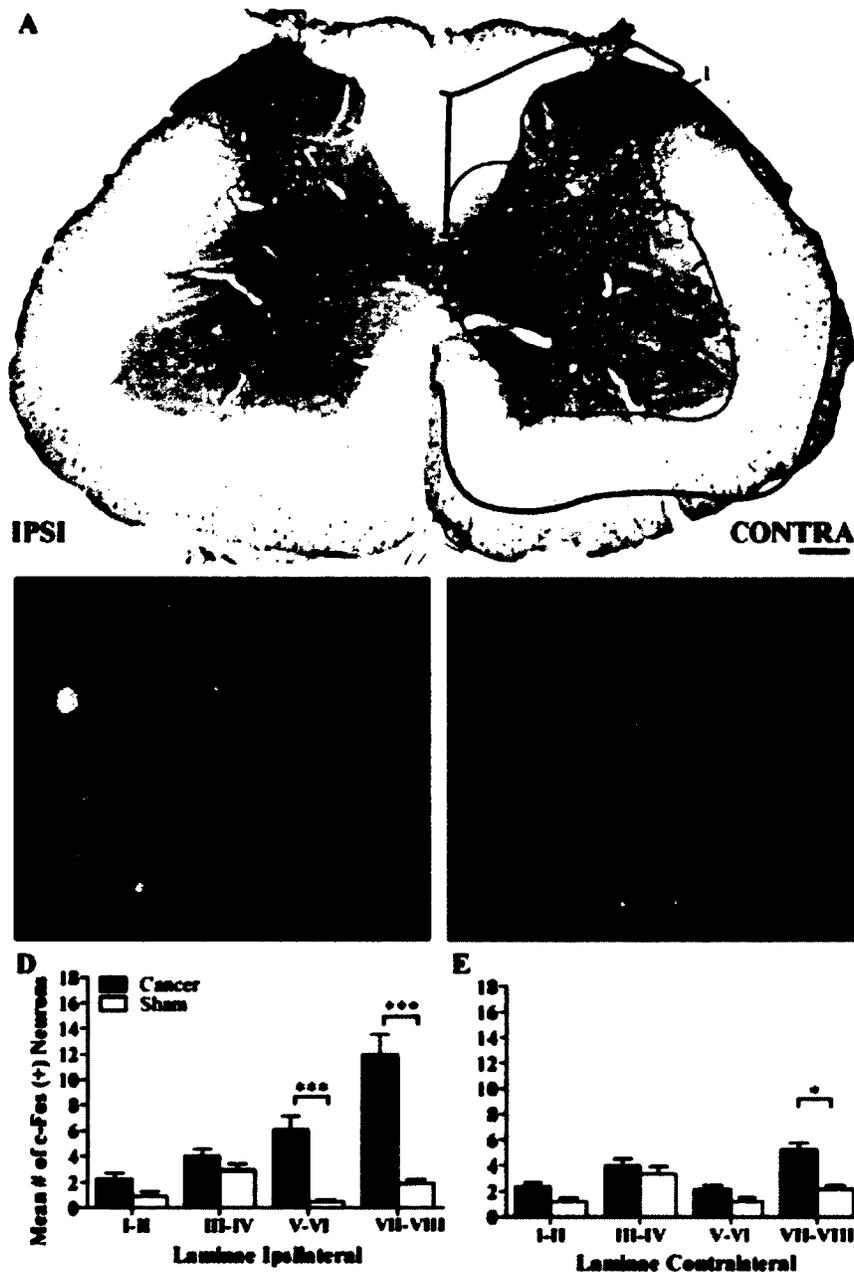


Figure 2. Expression of c-Fos protein in neurons of the spinal cord of bone cancer-bearing animals 14 days after implantation into the femur. (A) Photomicrograph of an L3 section of the spinal cord of a tumor-bearing rat depicting c-Fos protein's global expression profile. **(B-C)** High magnification of the ipsilateral and contralateral dorsal horn laminae V-VI, respectively. Black arrowheads point to c-Fos proteins only in the ipsilateral limb. **(D-E)** Histogram representations of Fos-LI neurons per laminae in cancer animals for ipsilateral and contralateral sides, respectively. Data are mean \pm S.E.M. number of Fos-LI neurons in the different spinal cord segments for sham and cancer rats (Scale bars, A: 200 μ m; B,C: 30 μ m; n = 23 sections from 3 rats/group; *: $p \leq 0.05$; ***: $p \leq 0.001$).

As the tumor cells filled the intramedullary space of the bone, a significant up-regulation of ATF-3 expression also occurred in sensory neurons of the ipsilateral DRG (Figs 3A, B). At 14 days of cancer development, ATF-3 reactivity was absent in sham and contralateral sensory neurons (Fig. 3C). Typically, ipsilateral cancer DRG sections displayed seven times more ATF3-positive neurons than their corresponding contralateral part or the sham group (Fig. 3D). As previously observed in sarcoma-injected animals[11], substance P (SP) and isolectin B4 (IB4) immunoreactivities, labeling peptidergic and non-peptidergic small projecting nociceptive fibers, respectively, remained unchanged (data not shown).

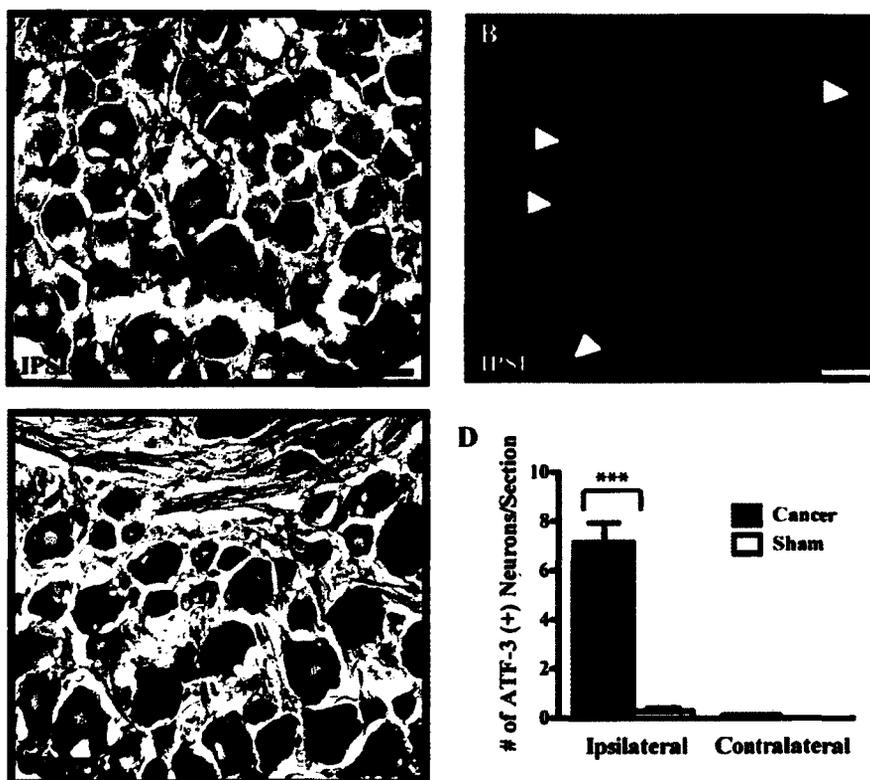


Figure 3. ATF-3 immunoreactivity in DRG neurons of bone cancer-bearing animals 14 days after implantation into the femur. (A) Primary ipsilateral L3 DRG subpopulations of sensory neurons showing ATF-3-IR-positive neurons marked by dark labeled nuclei with DAB staining (black arrowheads). **(B)** ATF-3 immunofluorescence labeling was performed to confirm the presence of Fos reactivity (white arrowheads). **(C)** Immunohistochemistry for ATF3 in the corresponding contralateral DRG. **(D)** Histogram representation of ATF-3 positive neurons per section in cancer and sham animals. Data are mean \pm S.E.M. number of ATF3-L1 neurons ($n = 24$ sections from 3 rats/group; ***: $p < 0.001$; scale bar: 50 μ m).

Further, glial involvement was determined with Iba1 and GFAP markers, labeling microglia and astrocytes, respectively (Fig. 4). Microglia are recognized as pathology sensors capable of reacting to neuronal disturbances. Iba1 staining was increased in the ipsilateral dorsal horn 14 days after cancer cell inoculation of the femur (Figs. 4A, B). Iba1 fluorescence intensity was increased by 36% in the ipsilateral dorsal horn in comparison to its contralateral counterpart ($p < 0.05$) and by 44% when compared to sham animals ($p < 0.05$; Table 1). The labeling appeared to be widespread across dorsal horn laminae I-V, with the most prominent increase observed in laminae III-IV (Fig. 4A). Ipsilateral hot spots displayed, under higher magnification, dense clusters of amoeboid-shaped cells that are characteristic of activated microglia (Fig. 4B). Surrounding this intense gliosis zone, processes of microglial cells were rather ramified and branched outside laminae IV to VI, more representative of resting microglia, as observed on the contralateral side (Fig. 4C). There was no statistical difference in Iba1 labeling between sham animals and the contralateral side of cancer-bearing rats (Table 1).

Table 1. Quantification of glial activity at the lumbar level of spinal cord in bone cancer after 14 days.

| | Iba1 | | GFAP | |
|---------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|
| | Ipsi | Contra | Ipsi | Contra |
| Cancer | 19.04±4.96 | 12.24±2.18 [#] | 48.02±3.61 | 46.97±4.20 |
| Sham | 10.83±1.97 [*] | 10.27±0.60 | 45.81±2.62 | 41.36±2.35 |

Table 1. Quantification of glial activity at the lumbar level of spinal cord in bone cancer after 14 days. Fluorescence immunohistochemistry was performed and quantified in dorsal spinal cord (L1-L3) of cancer-bearing and sham rats ($n=8$). Iba1 immunolabeling of microglia showed a significant increase in fluorescence intensity between ipsilateral and contralateral sides ($\#$; $p < 0.05$) and between carcinoma-implanted animals and sham-group ipsilateral sides ($*$; $p < 0.05$). GFAP immunostaining of astrocytes did not reveal any significant difference in fluorescence intensity thresholds between groups.

Normal and reactive astroglia were also detected 14 days post-surgery in L1-L3 spinal lumbar segments using GFAP (Fig. 4). Ipsilaterally, cancer-bearing rats displayed

hypertrophic astrocytes characterized by cell body enlargement and extensive arborization of their distal processes (Fig. 4D and insert). In contrast, GFAP-labeled astrocytes appeared in their basal, inactivated morphological state in sham animals and on the contralateral side (Fig. 4E). This astrogliosis observed at the immunohistological level was, however, not reflected in the quantification of GFAP staining (Table 1). Interestingly, the central canal area (lamina X) was highly labeled in lumbar spinal cord segments that receive primary afferent input from the affected femoral bone (Fig. 4F). These results indicate that both neuronal and glial cells were activated ipsilaterally during bone cancer development.

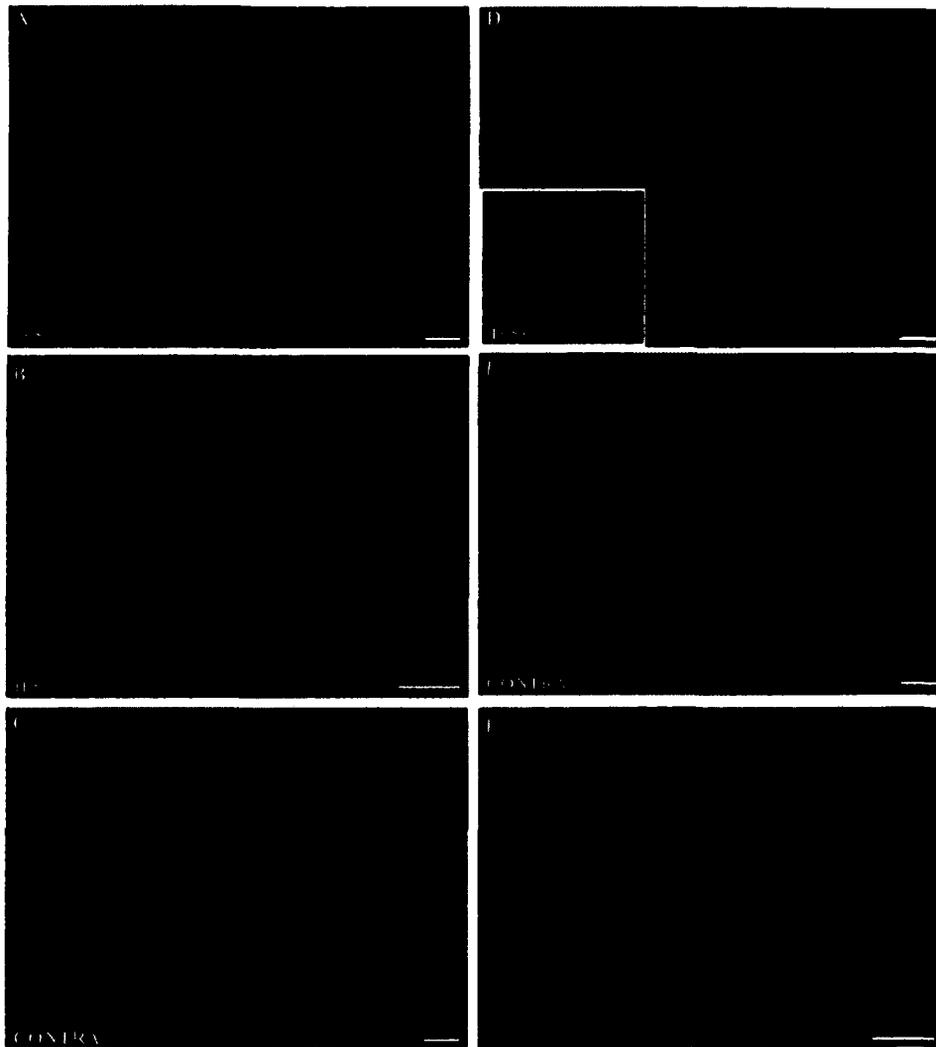


Figure 4. Microglia and GFAP staining in dorsal horn of the L3 spinal cord of rats at day 14 post-surgery. (A) An increase in Iba₁ labeling is observable in the ipsilateral dorsal horn. **(B)** At high magnification (**insert**), glial cells are morphologically characterized by an increase in the length of distal processes. **(C)** The carcinoma does not induce alterations in the contralateral spinal cord microglial pattern. **(D)** The distribution is relatively similar in the ipsilateral superficial dorsal horn; however, astrocyte cell bodies are hypertrophied (**insert**). **(E)** On the contralateral side, astrocytes are distributed homogenously throughout the superficial laminae. **(F)** An increase in GFAP-IR is observed around the central canal in laminae X. Scale bars A,C,D,E: 50 μm; D insert: 15 μm; B: 30 μm; F: 100 μm.)

Characterization of bone remodeling by faxitron and microcomputed tomodensitometry (μ CT)

X-rays were taken to evaluate the impact of cancer proliferation on solid structures of the bone (Fig. 5A). The first acquisitions showed a progressively degrading metaphysis throughout 21 days of observation. Osteopenia gradually increased from day 14 and the cortical line was blurred from day 18 (white arrowhead). At day 21, a bulge shape was forming due to irregular deposition of bone matrix by osteoblasts. At that time, some animals presented a fragile structure characteristic of an A3 comminuted metaphyseal fracture. Micro X-ray computed tomography (μ CT) was performed to provide insight into the loss in bone density and organization and to record trabecular bone morphometric parameters (modelization extrusion; Fig. 5B), as compared between sham and cancer-bearing rats. Scans showed a rough aspect from day 14 and severe progressive bone loss was observed at days 18 and 21. The dental amalgam was still in place and unaffected in the 21-day implanted femur. A global structural degradation was demonstrated by a decreasing volume ratio of whole bone structure (BV) over total volume of tissue (TV) in the region of interest (whole bone BV/TV; 65.8% and 75.3% decrease at days 14 and 21, $p < 0.01$; Fig. 5C). More precisely, the level of trabecular remodeling, determined by the ratio of trabecular BV over TV, was significantly lower in cancer-bearing animals compared to shams at day 14 (74.8% decrease), 18 (93.9%) and 21 (88.4%) ($p < 0.05$ and 0.01 ; Fig. 5D). By extrapolation, cortical bone degradation thus accounted for a large proportion of the degradation. Trabecular architecture weakening was also exposed by an increasing trend in trabecular pattern factor (+ 78.7% on day 18 (not shown)), representative of lower connectivity between bone fragments within the medullary canal. This altered architecture of the spongy bone may be attributable to tumoral and osteoclastic activity as well as to compensatory bone remodeling. The trabecular number, an indicator of bone density within the region of interest (ROI), was also drastically decreased at day 21 (80.1% of sham group, $p < 0.05$; not shown). Finally, these results support the osteolytic character of the tumor in the femur of male rats as exposed on X-rays.

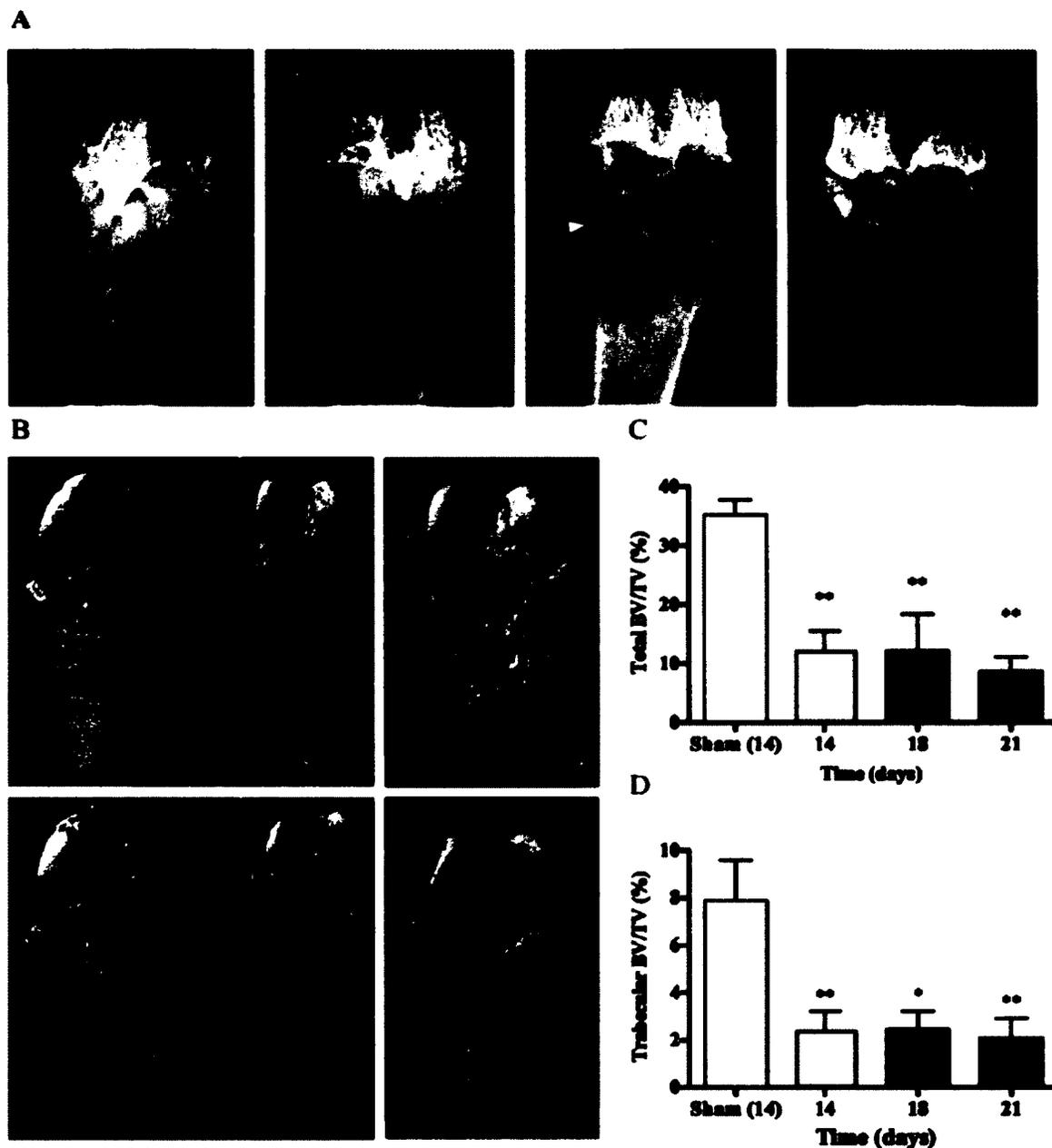


Figure 5. Radiological images of bone cancer-bearing rat femurs. (A) Faxitron anteroposterior radiographs of sham-operated and cancerous femur distal heads after 14, 18 and 21 days. At day 14, osteopenia is observed in the medullar canal of the bone while cortical integrity is maintained. At 18 days, the cortical line is blurred, characteristic of severe supracondylar osteopenia (arrowhead). Cortical bone integrity is partially compromised, contributing to the appearance of fracture. Twenty-one days after implantation, the bone shape is irregular due to anarchic matrix redeposition. An A3 metaphyseal complex fracture is present following such severe bone loss, affecting bone shape. (B) Microcomputed tomodensitometry of sham-operated and cancer-bearing rat femurs. The shaft represents cortical mineralized bone, while the extrusion represents trabecular bone. Sham femurs show intact structure and high cortical and trabecular

densities. After 14 days, the metaphyseal cortical bone surface becomes irregular and porous, while the epiphysis remains intact above the growth plate. Trabecular reconstruction at day 18 reveals extensive bone loss, while the cortical architecture weakens. At day 21, the bone integrity is seriously compromised and marked by signs of potential fracture. **(C)** Bone modeling is quantified by the measurement of bone volume/tissue volume ratios, expressed in %. Throughout the entire bone structure, proportional bone content is significantly modified from day 14, with a greater decrease in bone percentage at day 21. **(D)** When the analysis is limited to the cancellous bone only, the same modifications, this time in trabecular architecture, are observed. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; $n=4-5$).

Monitoring tumor proliferation and bone invasion by PET/MRI

MRI offers an excellent soft-tissue contrast[41] and information on tissue perfusion and microvessel permeability. Na^{18}F PET provides an assessment of bone integrity and turnover. When combined, these two imaging modalities yield a more complete picture of pathological bone status. Sagittal gadolinium-enhanced T_1 -weighted MR images of the tumor-implanted rats were acquired at days 0, 6, 8, 10, 13, 15, 18 and 21 (Fig. 6A). Artificial coloring of a selected region of interest of the sagittal images using thresholds established from a signal intensity histogram highlights the time-dependent nature of tumor progression (Fig. 6B). The intact femur at day 0 presented a regular cortical line and even perfusion of the bone marrow by contrast agent Gd-DTPA. At day 18, diffuse hyperintense medullary infiltration was observed throughout the diaphysis, corresponding to the tumor's spread (white arrowheads). The femoral shaft acquired a rougher aspect, with a fading cortical line proximal to the metaphysis. The bulge shape of the femoral head was consistent with the X-ray observations (Fig. 5A). Contrast enhancement was also observed in the surroundings of the bone, indicative of possible periosteal inflammation and edema (Figs. 6A, B; blue arrowheads). The medullary cavity was gradually invaded and the presence of hypointense regions was emphasized, characteristic of necrotic islets and amalgam artifacts at the site of injection (Fig. 6B; day 18, black arrowhead). Notably, the tumor was detected as early as day 8 post-implantation, thus 6 days prior to pain onset, as measured in the dynamic von Frey test (Fig. 1A). Na^{18}F PET images were co-registered to MR images for morphological reference (Fig. 6C). Fluoride ions are chemisorbed on bone hydroxyapatite crystals, providing insights on bone metabolism and structure and instantly reflecting increased uptake in the surroundings of bone metastases[42]. This

procedure is highly specific, indicative of bone turnover and of tumor aggressiveness at the time of the scan, a methodology that would otherwise require multiple sessions of CT scans to detect a pathological evolution. Day 18 images displayed a photopenic lesion at the distal metaphysis in comparison to the contralateral side (Fig. 6C; orange arrowheads). Moreover, the ipsilateral border of the metaphysis/diaphysis region was marked by intense sclerotic bone activity (white arrowhead). The latter phenomenon is characteristic of a predominantly lytic pattern in a mixed bone tumor, as encountered in the clinic[43,44].

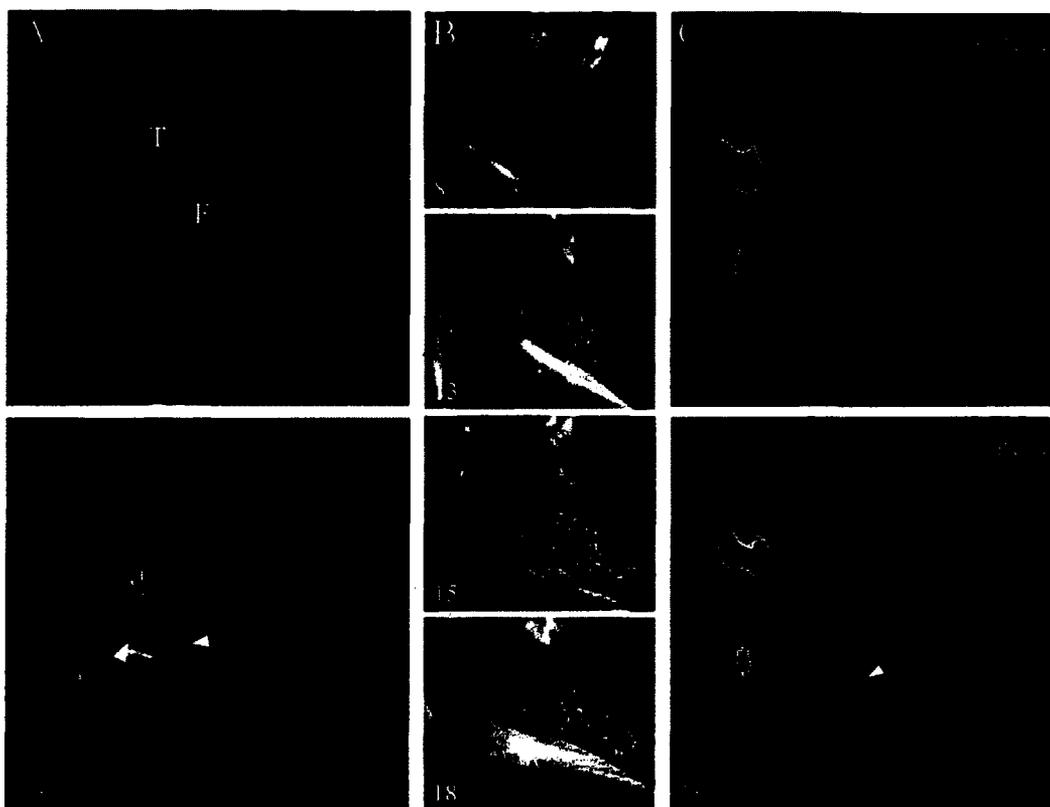


Figure 6. Medical imaging of bone tumor using MRI and PET. (A) Contrast-enhanced (Gd-DTPA) T₁-weighted magnetic resonance (MR) images of a rat coping with femoral bone cancer. Bone images of the proximal tibia (T) and whole femur (F) show dispersion of the contrast agent in normal (**top**) and cancerous (Day 18; **bottom**) bones in a sagittal plane (n=8). Cortical bone shows lower intensity (black), while soft-tissue areas are in shades of gray. Tumor proliferation affects the regular cortical line at day 18. Hyperintense areas within the medullary channel represent the tumor-affected distal part of the femur (white arrowheads). Enhanced areas outside the bone are characteristic of inflammation and edema (blue arrowhead). (B) Sagittal plane close-ups of the distal femur at different stages of tumor progression. Images are superimposed to artificial colors corresponding to voxel intensities and are indicative of tumor proliferation in the medullary channel. Tumor is detected at day 8 and its intensity and surface increase consistently throughout the experiment. Blue and black arrowheads label periosteal inflammation and necrotic clusters, respectively. (C) Sodium ¹⁸fluoride positron emission tomography scans of contralateral and ipsilateral cancer-bearing bones at day 18 post-cancer cell inoculation. The positioning remains the same between MRI and PET scans. Contralateral bone shows a high ¹⁸fluoride intake at the trabecular bone level, while the shaft of the femur remains lightly labeled. In contrast, the cancer-affected bone displays a markedly decreased signal at the distal extremity (orange arrowheads), while a high intensity signal is observable at the level corresponding to the proximal edge of the tumor area (white arrowhead). This is representative of substantial bone remodeling (n=3).

Histological overview of bone remodeling during tumor proliferation

The severity of the cancer model was also confirmed by classic histological approaches used to support non-invasive imaging data. The H&E staining enabled us to contrast healthy structures in the sham-operated group (Figs. 7A, B) after 21 days to cancer-bearing rats (Figs. 7C, D). Heavy signs of degradation, depicting an imbalance in osteo-clast/blast homeostasis, were identified in the trabecular spongy bone and ultimately replaced by necrotic clusters of tumor cells. Hematopoietic cells from the bone marrow were superseded by carcinoma cells. The cortical line was slender and irregular. However, we noted that despite the aggressiveness of the MRMT-1 cells, the calcified cartilage was unaffected and acted as a barrier to femoral epiphysis invasion (arrows). The chaotic architecture of the femur metaphysis structure in cancer-bearing animals was indicative of substantial lytic activity. We then evaluated the number of active multi-nucleated osteoclasts per surface, as measured using the Tartrate Resistant Acid Phosphatase staining protocol, which revealed brownish cytoplasmic staining indicative of osteoclasts (Figs. 7E, F, arrowheads). The number of osteoclasts per square millimeter was three times greater in the cancer group than in the sham-operated group (Fig 7G; $p < 0.001$). This massive lytic activity accounted for the severe osteopenia observed, which increased the risk of fracture within 21 days of experimentation.

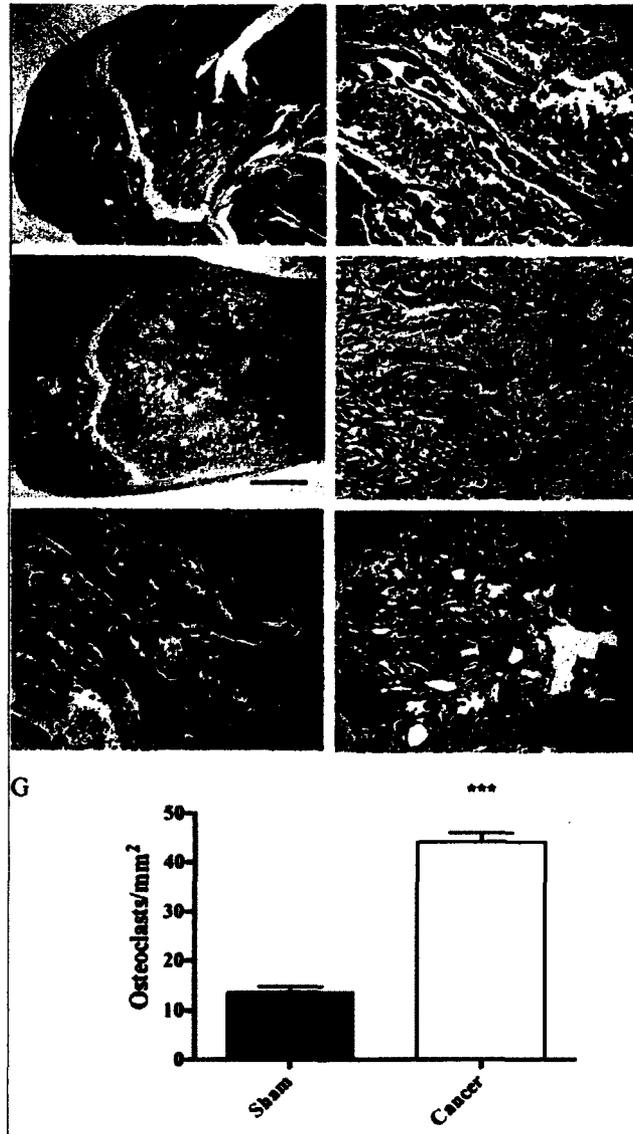


Figure 7. Hematoxylin & eosin coloration and quantification of TRAP staining in the rat distal femur at day 21 post-surgery. (A-B) Photomicrograph representative of the sham surgery group showing healthy bone structures (BM = Bone Marrow; SB = Spongy Bone). **(C-D)** Cancer-implanted bone illustrating an unstructured architecture. Note that the cartilage is still unaffected (arrows). Hematopoietic cells from the bone marrow are entirely replaced by proliferating MRMT-1 cells (Tu). Necrotic clusters (NC) appear in early areas of proliferation. Cancellous bone is sparsely deposited in a mosaic pattern, yielding fragile and disorganized bone. Larger lacunae and immature bone are indications of compensatory reconstruction. **(E-F)** Photomicrographs of trabecular bone stained with the TRAP coloration technique. Multinucleated active osteoclasts, bordering the hydroxyapatite matrix, are stained in brown-red (black arrows) in sham **(E)** and cancer-bearing **(F)** rats. **(G)** The number of differentiated osteoclasts per mm² is three times greater in cancer rats than in sham animals, explaining the accelerated degradation of bone structure. ***: $p < 0.001$ ($n=12$ for sham and $n=20$ for the cancer group). Scale bars A,C: 1 mm; B,D,E,F: 90 μ m.

Discussion

Bone cancer pain is a complex clinical syndrome; the mechanism remains to be elucidated. Advanced breast cancer often evolves towards bone dissemination and severe pain. Pre-clinical animal pain models mimicking relevant clinical observations will help to elucidate the mechanisms underlying the generation of pain and facilitate the development of preventative and palliative therapies.

A new model of bone cancer pain

Based on clinical observations, the femur is the most frequent site of breast metastases in long bones[28]. It is also the second most common site (35% of cases) of pathological fracture induced by bone cancer[45]. To this day, disseminating breast-to-bone models, although relevant, lead to high variability in the targeted sites, rendering study of the mechanisms of bone cancer pain genesis and maintenance difficult to isolate[32,33,46]. On the other hand, models using local bone implantation to mimic cancer pain often use cell lines from primary cancers such as fibrosarcoma[15,30,47,48,49,50]. Bone metastases secondary to breast cancers are more likely to induce chronic pain. Therefore, in the present study, we developed a model of bone cancer pain induced by the femoral invasion of breast carcinoma in the male rat. We cautiously chose to use male rats to avoid hormonal variations that are well-known to influence pain response[51,52] and considering the fact that we demonstrated that MRMT-1 cells express estrogen receptors. We felt that it was preferable to first pursue our investigation on males in order to limit those variations and compare the evolution of pain and the progression of bone remodeling to other reported cancer pain models. Indeed, MRMT-1 cells have been abundantly used in the past to assess bone cancer pain following breast cancer cell inoculation in either males[53,54,55,56,57] or females[9,20,21,24,58,59]. The behavioral, immunohistochemical, pathological and medical imaging approaches used to characterize, provide evidence that suggests a resemblance to the chronic and invasive pathology that develops in humans[60]. Importantly, we opted to minimize impairment due to the implantation step. Thus, the tumor is the exclusive source of pain and we avoid confounding variables (e.g., early inflammation, transient pain, locomotion discomfort

attributable to surgery). Recent models of bone cancer pain, targeting the femurs in mice, consisted in arthrotomy, displacement of the patellar ligament and knee joint alteration[24,30]. Affecting the subchondral bone can expose nociceptors in regions susceptible to biomechanical forces, thus amplifying weight-bearing pain[61]. The implantation approach suggested here does not result in pain or extraosseous inflammation.

A relevant evaluation of behavioral pain

Breakthrough pain episodes frequently occur as the tumor infiltrates the bone matrix. These transitory episodes of extreme pain are evoked by non-noxious movement or mechanical loading of the tumor-affected bone. Breakthrough pain at rest (spontaneous) and during ambulation (volitional) is the first presenting characteristic of patients consulting a physician for metastatic disease, is highly prevalent in bone cancer patient cohorts, and is also an indicator of fracture risk[62,63,64,65]. However, stimulus-evoked withdrawal thresholds remain the mainstay of pain evaluation. While we evaluated the consistency of the development of touch-evoked pain in previous bone cancer studies[13,24], we investigated volitional pain to maintain clinical relevance. Static weight bearing has been used to determine the difference between cancer-bearing and healthy paws. However, the animal is restrained and stressed, masking information that could potentially be used to describe volitional pain. Consequently, we tested a dynamic weight-bearing system to monitor weight distribution during free ambulation in an open enclosure. The weight borne by any standpoint of the animal and the surface of contact were measured over an extended period of observation by floor captors. Therefore, we gained a greater appreciation of volitional pain, supported by the fact that our animals showed no discomfort following the implantation procedure. Additionally, we demonstrated that weight was redistributed entirely upon standpoints other than the contralateral hind paw, such as the tail and front paws. Thus, analgesics proven efficient in reversing weight-bearing to initial values in a static apparatus might not reflect reality. To avoid bias in evaluation of analgesic potency, quadrupeds should be tested in a natural ambulation position, just as humans would be tested in a standing posture. Therefore the model proposed here should be more persuasive in the attempt to evaluate the effect of

analgesic treatments on volitional pain, ultimately resulting in more successful transfer of animal models to the clinic[64].

Neurochemical changes occurring in bone cancer pain

Bone cancer generates a profound reorganization in the DRG and spinal cord at both neuronal and glial levels. As previously observed in rat sensory and motor neurons following spinal and sciatic nerve injury[66,67] and recently in mouse bone cancer models[15,68,69,70], ATF-3 was shown to be up-regulated in DRG neuron somas 14 days after tumor implantation. This neuronal hyperactivity accompanying hyperalgesia and allodynia is also detected in the spinal cord, reflecting the central sensitization phenomena frequently observed in chronic pain states. In the present model, c-Fos-expressing neurons were significantly increased in deeper laminae V-VIII of the spinal cord following MRMT-1 carcinoma cell inoculation. However, in a previous study, sarcoma-induced c-Fos activation was observed in superficial layers I-II of the dorsal spinal horn[30,71]. In neuropathic pain, non-nociceptive A β fibers are stimulated, increasing neuronal firing towards lamina V-VI of the spinal cord[72]. Therefore, A β fiber over-activation may be related to acidic tumor environment or nerve compression, thus contributing to c-Fos activation in deep layers. In human, the quality of bone cancer pain is marked by substantial heterogeneity, either due to the cancer or resulting from the alteration of distinct bone structures. These discrepancies in c-Fos expression may therefore reflect sensory inputs conducted by unmyelinated or myelinated fibers innervating either the bone marrow, the mineralized bone, or the periosteum.

Glial cell phenotypic changes were also marked by astrocyte hypertrophy and distal processes of increased length, in both the dorsal and ventral ipsilateral lumbar L1-L3 spinal cord. Recruitment of activated astrocytes may contribute to the initiation and maintenance of persistent cancer and neuropathic pain states, as previously reported[73,74]. Interestingly, GFAP staining was intense in lamina X, a region known to relay visceral information. Tumor invasion of the marrow and the sinusoid walls of the distal metaphysis is likely to sensitize nerve fibers at this site and stimulate central astrocyte recruitment. Using a neurotropic viral approach, Denes and colleagues[75] infected bone marrow and demonstrated retrograde neuronal labeling of the central gray matter in lamina X of

lumbar segments after 4 days. This is in line with a high prevalence of referred visceral pain in the cancer population. In the present model, we also found a substantial increase in microglia in the ipsilateral dorsal horn, concurrent to the observations made by Zhang and colleagues[27] in the rat but in opposition to the unchanged staining previously obtained with OX-42 in mice[30,71]. Microglial activation was shown to peak after 1 week of injury and to decline over several weeks thereafter[76]. However, most of the bone cancer research groups performed analyses of duration ranging from 19 to 21 days. In our case, at day 14, we were able to observe hypertrophied microglial bodies in laminae V and a large number in other laminae, factors that represent a post-active or latent state in response to an insult. Whether microglia reactivity appears earlier than the activation of astrocytes in this bone cancer-induced pain model awaits further investigation.

Detection of early bone metastases by a clinical imaging approach

Most of the clinical problems associated with metastatic bone diseases are a result of tumor-induced dysregulation of abnormal bone turnover. The development of non-invasive imaging modalities (PET/MRI) providing early diagnosis of bone remodeling and allowing physicians to monitor the therapeutic response has provided advantages beyond those of plain film radiographs. Recent human studies also showed that Na¹⁸F PET is more sensitive than ⁹⁹Tc radionuclide bone scan in detecting metastases. In fact, Na¹⁸F PET allows physicians to detect all osteolytic metastases, while radionuclide bone scan detects only 49.3% of metastases[77]. Furthermore, a recent study revealed that MRI is superior to CT in detecting the presence and extent of bone marrow metastases[78]. CT could only identify 17% of these tumors, while MRI could reveal the presence of 83%. This is of crucial importance when choosing the appropriate treatment, as 24% of the patients saw their treatment modified after an MRI, as compared to the treatment prescribed after a prior CT scan[78]. Accordingly, PET/MRI holds the best potential to assess the potency or efficacy of tumor-suppressing treatments at preclinical and clinical levels[79].

Bone resorption and tumor growth are the most important aspects of pain onset[8,68]. Therapeutic validity would therefore be supported by an appropriate correlation between tumor development and activity profiles versus pain intensity. Our results reveal timely and reproducible detection and monitoring of bone tumor growth in the same animal by

MR imaging. This proves useful, considering that clinical and preclinical PET/CT analyses are limited by the amount of ionizing radiation applied to the subject, which can potentially reduce the frequency of follow-up sessions. Advantageously, MRI techniques developed for small animals are often adapted for use in humans. Further, our MRI studies allowed us to detect the tumor at day 8 post MRMT-1 cell inoculation, prior to pain onset in every case. Thus, the mechanical compression of bone tissues and the algogenic substances released by the bone environment and tumor at day 8 are not sufficient to exacerbate nociceptors and stimulate abnormal neuronal firing. Thus, detecting bone metastases before symptomatic pain would support a prophylactic approach in metastatic disease management. PET images showed decreased ^{18}F accumulation in the area affected by the tumor after administration of Na^{18}F . This confirms the high lytic character of the mammary carcinoma, since the high affinity of ^{18}F for bone hydroxyapatite normally results in large signal intensities in the normal trabecular bone. In contrast, accumulation of ^{18}F in the region surrounding the tumor was observed, indicative of active bone turnover. Increased osteoblastic activity induced in an attempt to compensate for the lytic activity of the tumor could account for the enhanced signal observed[7]. Indeed, a high number of osteoclasts were detected in the regions adjacent to the tumor in histological sections, and anarchic bone turnover was also seen in the femur metaphysis in cancer-bearing animals. Altogether, these observations show that metastases-induced loss of integrity in the tumor-bearing bone contributes to promoting movement-evoked breakthrough pain in cancer patients. Indeed, prevention of bone metabolism imbalance, through bisphosphonates therapy for example[18], in combination with early treatment of tumor progression and pain development – as well as their timely evolution – could be monitored using PET and MRI co-registration technology.

Aiming for osteoclastogenesis

Breast cancer usually displays a dominant lytic profile when it metastasizes to the bone[80]. This fact is also observed in our cancer model, as determined by μCT analyses that reveal a striking decrease in trabecular bone content. This is in accordance with the dense and slurry vascularization present within the trabeculae, rendering the bone ideal for embolus nesting. Tumor expanded beyond the limit of the compact cortical bone,

demonstrating the aggressiveness of the MRMT-1 cells in infiltrating and degrading the bone matrix. Extra-femoral spicules, characteristic of compensative bone formation were detected, consistent with other studies[7]. The trabecular pattern, an indicator of connectivity within the trabecular architecture, was strongly increased in cancer-bearing bones. In humans, biopsies are used for trabecular architecture evaluation[81,82]. Clinically, a higher trabecular pattern factor is correlated with a higher risk of fracture [83]. Close monitoring of these parameters and manifestations is important to minimize pain. Several observations from the present study emphasize the crucial role of osteoclasts in cancer-induced bone loss and in the etiology of bone cancer pain. Histological analyses demonstrated that tumor progression had a dramatic effect on osteoclast activity. Indeed, TRAP-positive multinucleated cells tripled in number and displayed typical hypertrophic bodies. This explains, in part, the decreased bone volume observed using the μ CT and the decreased ^{18}F uptake in the most affected areas of the bone. The tumor releases osteoclast maturation factors or stimulates osteoblast secretion of RANKL and down-regulation of osteoprotegerin, resulting in dominant resorptive activity[9,84,85]. In addition to prostaglandins and other factors released by the tumor, bone resorption results in the release of protons that will stimulate nociceptors. The number of osteoclasts is therefore an indicator of potential bone pain onset and should be screened in every bone cancer model.

Conclusion

While pain occurs at any time point during the course of the disease, in general, the more advanced the cancer, the more likely it is that the patient will experience intractable pain. The development of treatments to reduce the incidence of bone metastases is therefore of great clinical significance to improve the quality of life of bone cancer-bearing patients. Medical imaging at the site of the tumor in combination with pain assessment is the key to determine the efficacy of cancer treatments. Indeed, the evaluation of tumor progression could elucidate the onset of pain. With recent reports on the adverse effects of analgesic therapies on bone homeostasis[15], skeletal structure must be monitored during follow-up, in parallel with chronic pain management. The methods we propose in this animal model

are based on clinical multimodal approaches and are intended to optimize the research and development of therapeutic strategies for bone cancer pain.

References

1. Coleman RE, Rubens RD (1985) Bone metastases and breast cancer. *Cancer Treat Rev* 12: 251-270.
2. Coleman RE, Rubens RD (1987) The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 55: 61-66.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, et al. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 58: 71-96.
4. Mercadante S, Fulfaro F (2007) Management of painful bone metastases. *Current opinion in oncology* 19: 308-314.
5. Honore P, Mantyh PW (2000) Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain medicine (Malden, Mass)* 1: 303-309.
6. Roato I, Grano M, Brunetti G, Colucci S, Mussa A, et al. (2005) Mechanisms of spontaneous osteoclastogenesis in cancer with bone involvement. *FASEB J* 19: 228-230.
7. Harvey HA, Cream LR (2007) Biology of bone metastases: causes and consequences. *Clinical breast cancer* 7 Suppl 1: S7-S13.
8. Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP (2002) Molecular mechanisms of cancer pain. *Nature reviews Cancer* 2: 201-209.
9. 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.
10. Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, et al. (2002) Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* 113: 155-166.
11. Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, et al. (2000) Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98: 585-598.
12. Kirou-Mauro AM, Hird A, Wong J, Sinclair E, Barnes EA, et al. (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.
13. Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Mach DB, Pomonis JD, et al. (2002) Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. *Pain* 99: 397-406.
14. Nicholson B (2003) Responsible prescribing of opioids for the management of chronic pain. *Drugs* 63: 17-32.
15. King T, Vardanyan A, Majuta L, Melemedjian O, Nagle R, et al. (2007) Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. *Pain* 132: 154-168.
16. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L (2006) Fracture risk associated with the use of morphine and opiates. *J Intern Med* 260: 76-87.
17. Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, Yogendran G, Sukovic T, et al. (2006) Phase II trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite

- first-line bisphosphonate therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24: 4895-4900.
18. Coleman R (2007) Potential use of bisphosphonates in the prevention of metastases in early-stage breast cancer. *Clinical breast cancer* 7 Suppl 1: S29-35.
 19. Lipton A (2007) Efficacy and safety of intravenous bisphosphonates in patients with bone metastases caused by metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer* 7 Suppl 1: S14-20.
 20. Ogawa K, Mukai T, Asano D, Kawashima H, Kinuya S, et al. (2007) Therapeutic effects of a ¹⁸⁶Re-complex-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain in an animal model. *J Nucl Med* 48: 122-127.
 21. Walker K, Medhurst SJ, Kidd BL, Glatt M, Bowes M, et al. (2002) Disease modifying and anti-nociceptive effects of the bisphosphonate, zoledronic acid in a model of bone cancer pain. *Pain* 100: 219-229.
 22. Malden NJ, Pai AY (2007) Oral bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws: three case reports. *British dental journal* 203: 93-97.
 23. Wacnik PW, Eikmeier LJ, Ruggles TR, Ramnaraine ML, Walcheck BK, et al. (2001) Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 9355-9366.
 24. Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, Kidd BL, Glatt M, et al. (2002) A rat model of bone cancer pain. *Pain* 96: 129-140.
 25. Zwolak P, Dudek AZ, Bodempudi VD, Nguyen J, Hebbel RP, et al. (2008) 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.
 26. Mao-Ying QL, Zhao J, Dong ZQ, Wang J, Yu J, et al. (2006) A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1292-1298.
 27. Zhang RX, Liu B, Wang L, Ren K, Qiao JT, et al. (2005) Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain* 118: 125-136.
 28. Lee YT (1983) Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol* 23: 175-180.
 29. Luger NM, Honore P, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, et al. (2001) Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer research* 61: 4038-4047.
 30. Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, et al. (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 10886-10897.
 31. Sabino MA, Luger NM, Mach DB, Rogers SD, Schwei MJ, et al. (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. *International journal of cancer/Journal international du cancer* 104: 550-558.
 32. Rozel S, Galban CJ, Nicolay K, Lee KC, Sud S, et al. (2009) Synergy between anti-CCL2 and docetaxel as determined by DW-MRI in a metastatic bone cancer model. *J Cell Biochem* 107: 58-64.

33. Bauerle T, Adwan H, Kiessling F, Hilbig H, Armbruster FP, et al. (2005) Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein. *Int J Cancer* 115: 177-186.
34. Costelloe CM, Rohren EM, Madewell JE, Hamaoka T, Theriault RL, et al. (2009) Imaging bone metastases in breast cancer: techniques and recommendations for diagnosis. *Lancet Oncol* 10: 606-614.
35. Omoumi P, Mercier GA, Lecouvet F, Simoni P, Vande Berg BC (2009) CT arthrography, MR arthrography, PET, and scintigraphy in osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* 47: 595-615.
36. Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10: 283-294.
37. Harada Y (1975) Induction of metastasizing carcinoma in rats and their biological characteristics. *Acta Pathol Jpn* 25: 451-461.
38. Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G (2009) *The Spinal Cord; a Christopher and Dana Reeve foundation text and atlas*; Watson C, editor. London: Academic Press. 387 p.
39. Sevcik MA, Luger NM, Mach DB, Sabino MA, Peters CM, et al. (2004) Bone cancer pain: the effects of the bisphosphonate alendronate on pain, skeletal remodeling, tumor growth and tumor necrosis. *Pain* 111: 169-180.
40. Edoff K, Grenegard M, Hildebrand C (2000) Retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemistry of sensory neurones projecting to the cartilaginous distal femoral epiphysis of young rats. *Cell Tissue Res* 299: 193-200.
41. Schmidt GP, Reiser MF, Baur-Melnyk A (2009) Whole-body imaging of bone marrow. *Semin Musculoskelet Radiol* 13: 120-133.
42. Vallabhajosula S (2007) (18)F-labeled positron emission tomographic radiopharmaceuticals in oncology: an overview of radiochemistry and mechanisms of tumor localization. *Semin Nucl Med* 37: 400-419.
43. Petren-Mallmin M, Andreasson I, Ljunggren O, Ahlstrom H, Bergh J, et al. (1998) Skeletal metastases from breast cancer: uptake of 18F-fluoride measured with positron emission tomography in correlation with CT. *Skeletal Radiol* 27: 72-76.
44. Schirrmester H (2007) Detection of bone metastases in breast cancer by positron emission tomography. *Radiol Clin North Am* 45: 669-676, vi.
45. Coleman RE (2006) Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12: 6243s-6249s.
46. Canon JR, Roudier M, Bryant R, Morony S, Stolina M, et al. (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.
47. Mouedden ME, Meert TF (2007) Pharmacological evaluation of opioid and non-opioid analgesics in a murine bone cancer model of pain. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*.
48. 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.
49. Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Meana A, Garcia E, et al. (2003) Peripheral opioids act as analgesics in bone cancer pain in mice. *Neuroreport* 14: 867-869.

50. Hald A, Ding M, Egerod K, Hansen RR, Konradsen D, et al. (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.
51. Aloisi AM, Bonifazi M (2006) Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav* 50: 1-7.
52. Cairns BE, Gazerani P (2009) Sex-related differences in pain. *Maturitas* 63: 292-296.
53. Donovan-Rodriguez T, Dickenson AH, Urch CE (2004) Superficial dorsal horn neuronal responses and the emergence of behavioural hyperalgesia in a rat model of cancer-induced bone pain. *Neurosci Lett* 360: 29-32.
54. Donovan-Rodriguez T, Dickenson AH, Urch CE (2005) Gabapentin normalizes spinal neuronal responses that correlate with behavior in a rat model of cancer-induced bone pain. *Anesthesiology* 102: 132-140.
55. Donovan-Rodriguez T, Urch CE, Dickenson AH (2006) Evidence of a role for descending serotonergic facilitation in a rat model of cancer-induced bone pain. *Neurosci Lett* 393: 237-242.
56. Urch CE, Donovan-Rodriguez T, Dickenson AH (2003) Alterations in dorsal horn neurones in a rat model of cancer-induced bone pain. *Pain* 106: 347-356.
57. Urch CE, Donovan-Rodriguez T, Gordon-Williams R, Bee LA, Dickenson AH (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.
58. Beyreuther BK, Callizot N, Brot MD, Feldman R, Bain SC, et al. (2007) Antinociceptive efficacy of lacosamide in rat models for tumor- and chemotherapy-induced cancer pain. *Eur J Pharmacol* 565: 98-104.
59. Fox A, Medhurst S, Courade JP, Glatt M, Dawson J, et al. (2004) Anti-hyperalgesic activity of the cox-2 inhibitor lumiracoxib in a model of bone cancer pain in the rat. *Pain* 107: 33-40.
60. Mercadante S (1997) Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain* 69: 1-18.
61. Niv D, Gofeld M, Devor M (2003) Causes of pain in degenerative bone and joint disease: a lesson from vertebroplasty. *Pain* 105: 387-392.
62. Aebi M (2003) Spinal metastasis in the elderly. *Eur Spine J* 12 Suppl 2: S202-213.
63. Donthineni R (2009) Diagnosis and staging of spine tumors. *Orthop Clin North Am* 40: 1-7, v.
64. Mercadante S, Villari P, Ferrera P, Arcuri E, David F (2009) Opioid switching and burst ketamine to improve the opioid response in patients with movement-related pain due to bone metastases. *Clin J Pain* 25: 648-649.
65. Riccio AI, Wodajo FM, Malawer M (2007) Metastatic carcinoma of the long bones. *Am Fam Physician* 76: 1489-1494.
66. Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, et al. (2000) Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15: 170-182.
67. Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, Yi D, Tokunaga A, et al. (2003) Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain* 101: 65-77.

68. Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, Kubota K, Lindsay TH, et al. (2005) Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Exp Neurol* 193: 85-100.
69. Ghilardi JR, Rohrich H, Lindsay TH, Sevcik MA, Schwei MJ, et al. (2005) Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci* 25: 3126-3131.
70. Sevcik MA, Ghilardi JR, Peters CM, Lindsay TH, Halvorson KG, et al. (2005) Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain* 115: 128-141.
71. Honore P, Schwei J, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, et al. (2000) Cellular and neurochemical remodeling of the spinal cord in bone cancer pain. *Progress in brain research* 129: 389-397.
72. Dworkin RH (2002) An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. *Clin J Pain* 18: 343-349.
73. Romero-Sandoval A, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA (2008) Spinal microglial and perivascular cell cannabinoid receptor type 2 activation reduces behavioral hypersensitivity without tolerance after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 108: 722-734.
74. Hald A, Nedergaard S, Hansen RR, Ding M, Heegaard AM (2009) Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. *Eur J Pain* 13: 138-145.
75. Denes A, Boldogkoi Z, Uhereczky G, Hornyak A, Rusvai M, et al. (2005) Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. *Neuroscience* 134: 947-963.
76. Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10: 1361-1368.
77. Schirrmeister H, Guhlmann A, Elsner K, Kotzerke J, Glatting G, et al. (1999) Sensitivity in detecting osseous lesions depends on anatomic localization: planar bone scintigraphy versus 18F PET. *J Nucl Med* 40: 1623-1629.
78. Muller-Horvat C, Radny P, Eigentler TK, Schafer J, Pfannenberger C, et al. (2006) Prospective comparison of the impact on treatment decisions of whole-body magnetic resonance imaging and computed tomography in patients with metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 42: 342-350.
79. Pichler BJ, Wehrl HF, Kolb A, Judenhofer MS (2008) Positron emission tomography/magnetic resonance imaging: the next generation of multimodality imaging? *Semin Nucl Med* 38: 199-208.
80. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA (2007) Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 6: 2609-2617.
81. Rauch F (2009) Bone Biopsy: Indications and Methods. *Endocr Dev* 16: 49-57.
82. Armamento-Villareal R, Napoli N, Diemer K, Watkins M, Civitelli R, et al. (2009) Bone turnover in bone biopsies of patients with low-energy cortical fractures receiving bisphosphonates: a case series. *Calcif Tissue Int* 85: 37-44.
83. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Dellling G (1992) Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 13: 327-330.

84. Halvorson KG, Sevcik MA, Ghilardi JR, Rosol TJ, Mantyh PW (2006) Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. *Clin J Pain* 22: 587-600.
85. Roodman GD, Dougall WC (2008) RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* 34: 92-101.

A micro-imaging study linking bone cancer pain to tumor growth and bone resorption in a rat model.

Auteurs de l'article : Louis Doré-Savard, Nicolas Beaudet, Luc Tremblay, Yongjun Xiao, Martin Lepage et Philippe Sarret

Statut de l'article : En révision après une première évaluation par le journal *Clinical and Experimental Metastasis*

Avant-propos : Cet article s'inscrit comme la suite du processus de caractérisation de notre modèle. En effet, nous avons voulu répondre aux interrogations soulevées pendant la révision de notre première article : dans quelle mesure les paramètres observés, surtout en imagerie, sont-ils liés aux niveaux de douleur mesuré en comportement? Dans cet article, j'ai participé à toutes les étapes de la réalisation des expériences jusqu'à l'écriture de l'article, en passant par la récolte des échantillons et l'analyse des images.

A micro-imaging study linking bone cancer pain with tumor growth and bone resorption in a rat model.

Le traitement de la douleur induite par des métastases osseuses demeure encore aujourd'hui un défi important en clinique. En effet, une grande proportion de patients est insatisfait de la prise en charge de leur douleur et obtient un soulagement incomplet, en particulier pendant les épisodes de douleur spontanée intense. Malgré leurs effets secondaires, les opiacés demeurent le traitement en vigueur pour les patients atteints d'un cancer en stade avancé. Le récent développement de modèles précliniques a permis d'améliorer notre compréhension de la douleur cancéreuse osseuse. Afin de reproduire de façon plus réaliste la douleur cancéreuse, nous avons récemment présenté un nouveau modèle animal consistant en l'implantation de cellules cancéreuses mammaires syngéniques dans le fémur du rat. En parallèle, nous avons développé une approche innovante d'imagerie médicale non-invasive afin de visualiser l'impact de la croissance tumorale sur le microenvironnement osseux. La présente étude vise à établir quelle est la corrélation entre les niveaux de douleur observés chez l'animal et les paramètres acquis en imagerie. À l'aide de l'imagerie par résonance magnétique, nous avons d'abord estimé le volume de la tumeur à différents stades de son développement. Par la suite, nous avons observé une forte corrélation négative entre ce volume et le niveau d'allodynie mécanique ainsi que les changements de distribution pondérale chez l'animal. La résorption osseuse est aussi un phénomène associé à la douleur. Immédiatement après les acquisitions en IRM, les fémurs ont été prélevés et scannés à l'aide d'un μ CT haute résolution. Le contenu en matrice osseuse minéralisée par rapport au volume total (BV/TV) a été calculé aux niveaux trabéculaire et cortical. La dégradation de l'os cortical et de l'os trabéculaire contribue de manière significative à l'apparition de l'allodynie. De la même manière, cette résorption est corrélée aux changements de distribution pondérale observés à l'aide du Dynamic Weight Bearing Test. Cette étude démontre un lien étroit entre le niveau de douleur chez l'animal et la progression de la maladie. Ainsi, nous faisons la promotion d'un suivi serré en douleur afin d'être en mesure d'effectuer une détection des métastases osseuses dans une fenêtre de temps favorisant un traitement efficace. Les outils utilisés dans notre étude permettront aussi un suivi serré du traitement de la douleur ou du cancer.

A micro-imaging study linking bone cancer pain with tumor growth and bone resorption in a rat model

**Louis Doré-Savard¹, Nicolas Beaudet¹, Luc Tremblay², Yongjun Xiao³, Martin Lepage²
and Philippe Sarret^{1#}**

¹Department of Physiology and Biophysics; ²Departement of nuclear medicine and radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

³The Center for Bone and Periodontal Research, McGill University, Montreal, Québec, Canada.

Running Title: Towards a better understanding of bone cancer pain

Number of text pages: 36

Number of words in abstract: 252

Number of figures: 6

Number of tables: 0

#Corresponding author:

Philippe Sarret, Ph.D.

Department of Physiology and Biophysics

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

3001, 12^e Avenue Nord

Sherbrooke, Québec, Canada

J1H 5N4

Tel: (819) 820-6868 #15760

Fax: (819) 820-6887

Email: Philippe.Sarret@USherbrooke.ca

Keywords: Metastasis, MRI, Micro-CT, Dynamic Weight Bearing, Allodynia

Abstract

Bone metastases represent a frequent complication of advanced breast cancer. As tumor growth-induced bone remodeling progresses, episodes of severe pain and fractures of weight-bearing limbs increase. All of these skeletal-related events influence the patient's quality of life and survival. In the present study, we sought to determine whether some of these pain-related behaviors could be directly correlated to tumor progression and bone remodeling. For this purpose, we used a rat model of bone cancer pain based on the implantation of mammary carcinoma cells in the medullary cavity of the femur. The bone content and tumor growth were monitored over time by magnetic resonance imaging (MRI) and micro x-ray computed tomography (μ CT). The same animals were evaluated for changes in their reflexive withdrawal responses to mechanical stimuli (allodynia) and weight-bearing deficits. As assessed by MRI, we found a negative correlation between tumor volume and allodynia or postural deficits throughout the experiment. Using μ CT, we found that the bone volume/total volume (BV/TV) ratios for trabecular and cortical bone correlated with both mechanical hypersensitivity and weight-bearing impairment. However, whereas trabecular BV/TV stabilized between days 7 and 10 post-tumor detection, the cortical bone loss reached its maximum at that time. Our imaging approach also allowed us to consistently detect the tumor before the onset of pain, paving the way for the preemptive identification of at-risk patients. Altogether, these results improve our understanding of the events leading to tumor-induced bone pain and could eventually help in the design of novel strategies for the management of bone diseases.

Introduction

Bone is the most common site of distant metastases in breast cancer [1]. At post-mortem examination, up to 70% of all patients who die of breast cancer show bone lesions [2, 3]. In the United States alone, this percentage represents more than 150,000 patients among those experiencing invasive breast cancer [4]. Bone metastases in breast cancer patients most frequently induce osteolytic lesions, which increase the risk for skeletal-related events, such as pathological fractures and debilitating bone pain [5-7]. These skeletal complications are recognized to increase mortality, decrease the quality of life (through weight-bearing deficits and social isolation), and affect treatment strategies [8]. In particular, a recent review estimated that 65% of bone metastasis patients were coping with pain, and one-third of these patients graded their pain as moderate to severe [9]. Further clinical investigations concluded that at least 45% of cancer patients found their pain to be undermanaged [10, 11]. Bone cancer pain management thus remains challenging for researchers and clinicians.

The development of clinical applications has most likely been impeded in part by a lack of knowledge about the underlying mechanisms driving this chronic pain condition. In recent years, however, the establishment of preclinical animal models of metastasis-induced pain has significantly improved our understanding of the pathophysiology of bone cancer pain and has helped identify new molecular targets [12, 13]. In particular, the development of rodent animal models of bone cancer pain, based on the implantation of cancer cells into the medullary cavity of the long bones, has provided us with new insights on the mechanisms leading to bone cancer pain [14-17]. For instance, three main components of bone metastasis have been defined as pain-inducing factors: 1) nerve injury and sprouting caused by tumor growth [18-21], 2) inflammatory cascades and acidosis triggered by tumor and bone-associated cells [22-24] and 3) bone remodeling [25-27]. These animal models thus offer new opportunities for evaluating potential analgesic therapies to relieve bone cancer pain [28].

The detection and localization of metastatic bone lesions are important for determining the stage of breast cancer. Therefore, the use of powerful imaging technologies has become critical for the *in vivo* monitoring of tumor progression, assessment of bone

integrity and measurement of therapeutic efficacy. Among the different bone imaging modalities, whole body scintigraphy, plain film radiography and computed tomography (CT) are often used to diagnose breast cancer bone metastases [29, 30]. However, single photon emission computed tomography (SPECT or SPECT/CT), positron emission tomography (PET or PET/CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are increasingly recommended to optimize the bone or tumor anatomical visualization and detect changes in tumor or bone metabolism [31-36].

The early diagnosis of bone metastasis may improve the patient's prognosis and quality of life [37-39]. Because bone pain is the most common symptom in breast cancer patients, relating it quantitatively to tumor growth and bone damage would enable all dimensions of cancer management to be improved. According to the most recent version of the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors [40], defining the osteolytic lesion size by CT and the soft-tissue impairment by MRI are the current standards for breast cancer patients with metastases [35]. In the present study, we therefore investigated whether bone cancer pain could be directly correlated with tumor progression and bone remodeling. We used an experimental model in which MRMT-1 mammary carcinoma cells were implanted in the medullary cavity of the femur of Sprague-Dawley rats [41]. We examined whether these two imaging modalities allowed an early, quantitative and temporal correlation with changes in the reflexive withdrawal responses to mechanical stimuli and the observation of weight-bearing deficits.

Materials and methods

Cell culture

Mammary rat metastasis tumor (MRMT-1) cells (carcinoma) were kindly provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University 4-1, Seiryō, Aoba-ku, Sendai, Japan) and harvested in RPMI 1640 medium (Gibco, Montreal, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (heat-inactivated) and 2% penicillin/streptomycin (Gibco). The cells were detached by a brief exposure to 0.25% w/v trypsin-EDTA (Gibco, Montreal, Qc, Canada) and then prepared for femoral inoculation. Briefly, the cells were pelleted by centrifugation (3 min at 350 g), rinsed with 1 mL of Hank's balanced salt solution without calcium, magnesium or phenol (HBSS; Gibco, Montreal, Qc, Canada) and further centrifuged using the same conditions. The pellet was re-suspended in 1 mL of HBSS, and the cells were counted with a hemocytometer. The cells were diluted to achieve a final concentration of 30,000 cells in 20 μ L and maintained on ice prior to surgery.

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats (200–225 g; Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were maintained on a 12 hrs light/dark cycle with access to food and water ad libitum. Animal-related procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke and conducted according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). The rats were acclimatized to the animal facility for 4 days and to the manipulations and devices prior to the behavioral studies for 2 days. Note that the animals tested for pain and used for the imaging studies were the same except when several imaging procedures were performed on the same animals over time (Figure 2). Indeed, multiple prolonged exposures to anesthesia tend to modify behavioral responses to pain.

Surgical induction of bone cancer

The surgical procedure was the same as in Doré-Savard et al. [41]. Briefly, the rats

were laid supine, and the skin overlying the *quadriceps femoris* of the hind paw was shaved and disinfected with 70% v/v ethanol. A minimal skin incision (8-10 mm) exposed the *quadriceps femoris*. The *vastus lateralis* was incised (5-8 mm in length) to expose the femoral epicondyle while the patellar ligament remained untouched. The damage to the surrounding muscle and blood vessels was minimal. Using a 0.8 A stereotaxic drill (Foredom, Bethel, CT, USA) connected to a 1.75 mm carbide steel burr (Stoelting Co., WoodDale, IL, USA), a small and superficial cavity was burred between the medial epicondyl and the adductor tubercle (approximately 1 mm in depth). A 25-gauge needle was inserted into the cavity at a 45° angle, allowing it to reach the intramedullary canal of the femur. The needle was substituted with a blunt end 25-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe containing 20 µL of the MRMT-1 cancer cell suspension. The syringe was left in place for 1 min to allow cell dispersion within the bone marrow. The needle was then removed, and the cavity was sealed with dental amalgam (Prodigy A3, Kerr, Orange, CA, USA) that was polymerized with a curing light (QHL75, Dentsply, Milford, DE, USA). The site was thoroughly washed with sterile deionized water. The muscle, conjunctive tissue and skin were closed with sutures and washed with 3% v/v hydrogen peroxide. The sham animals received the complete surgical procedure except for the implantation of mammary cells, which was replaced by vehicle injection (20 µl HBSS). The rats were housed individually for 24 hrs to allow recovery. As demonstrated previously [41], the impact of surgery was minimized by implantation at this anatomical site, which reduces the chances of patellar ligament or joint damage.

Behavioral analyses

The animals were tested on days 0, 7, 11, 14, 18 and 21 after cell implantation. For von Frey testing, the rats were placed in enclosures on an elevated wire mesh floor, and mechanical allodynia was assessed using a dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Stoelting, IL, USA). A metal probe (0.5 mm diameter) was directed against the hind paw pad, and an upward force was exerted (3.33 g/second). The force required to elicit a withdrawal response was measured in grams and automatically registered when the paw was withdrawn or the preset cut-off was reached (50 g). Five values were taken alternately on both the ipsilateral (operated side) and contralateral hind paws at intervals of 15 s. The

rats were acclimatized to the enclosures for 2 days prior to testing.

The dynamic weight bearing (DWB) assessment was performed according to the procedure described by Tétreault et al. [42]. In brief, the dynamic weight bearing (DWB) device (Bioseb, Boulogne, France) consisted of a Plexiglas enclosure (22 × 22 × 30 cm) with a floor sensor composed of 44 × 44 captors (10.89 mm² per captor). A digital camera was placed beside the cage and was pointed towards the enclosure. The rats were allowed to move freely within the apparatus for 5 min while the pressure data and live recording were transmitted to a laptop computer via a USB interface. The raw pressure and visual data were colligated with the DWB software v1.3 (Bioseb). A zone was considered valid when the following parameters were detected: ≥ 4 g on 1 captor with a minimum of 2 adjacent captors recording ≥ 1 g. For each time segment in which the weight distribution was stable for more than 0.5 sec, the zones that met the minimal criteria were then validated and assigned as either right or left hind paw or front paw by an observer according to the video and the scaled map of the activated captors. Finally, a mean value for the weight on every limb was calculated for the whole testing period based on the length of time of each validated segment. The animals were not acclimatized to the enclosure before the initial testing period to maximize the exploration behaviors. For the behavioral analyses shown in Figure 1, the time axis was based on the post-implantation days, ranging from 0 to 21.

MRI

MRI studies were conducted at the Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS) with a 210 mm small-animal 7T scanner (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) and a 63 mm volume RF coil. The rats were placed in the supine position in an MRI compatible cradle equipped with a custom-made paw support designed to position both limbs stably and reproducibly. The animals were anaesthetized with 3% (induction) and 1.5% (stabilization) isoflurane in oxygen. A feedback-controlled animal warm-air heater system was used to keep the animal's body temperature at physiological levels, and the respiration rate was continuously monitored (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA). The MRI protocol included the acquisition of axial (sagittal) pre-contrast and 10 min post-

contrast T1-weighted images using a gradient echo sequence with TR of 210 ms, TE of 3.35 ms, flip angle of 30°, matrix of 256 × 256, FOV of 60 × 60 mm², NA of 8 (30 sagittal slices), and thickness of 1.5 mm. A 500 mL bolus of the contrast agent (Gd-DPTA, Magnevist, Berlex) was injected via the tail vein. The animals were imaged 9, 11, 13, 15, 18 and 21 days after the tumor implantation. To evaluate the tumor invasiveness, a region of interest (ROI), including the whole bone cortex, medullar channel of the femur and emerging tumor outside the bone when present, was defined for each slice displaying bone or tumor tissue. This ROI yielded a voxel intensity histogram for both hind paws. The contralateral maximal voxel intensities were used to set the pathological threshold. Every ipsilateral voxel remaining was colored according to its intensity on a yellow-red scale. The data analysis and calculations were programmed in the Matlab environment (Version 7.10; MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

μCT

The μCT scans were performed using a high resolution Micro-CT scanner (SkyScan-1072, Aartselaar, Belgium), and the subsequent 3D architecture analyses were completed using the associated software applications. The scanner was equipped with a sealed microfocus X-ray tube with a power source ranging from 20 to 100 kV (0 to 250 μA) and an X-ray CCD-camera based on a cooled 12-bit CCD-sensor of 1024x1024 pixels.

In the present study, the distal femurs, wrapped with parafilm to prevent dehydration, were scanned at a source power of 80 kV/124 μA and a spatial resolution of 14.06 μm/pixel. The rotation was set at 0.9 degrees/step for 180 degrees, and the exposure time was set at 3.0 sec/step. The reconstruction of the dataset of the X-ray shadow images obtained from the scans was performed using NRecon (version 1.6.1.3), generating a dataset of cross-sections that was then used for the analysis of the 3D architectural parameters and the creation of 3D models with CT-Analyzer (version 1.10.01). The ratios of bone volume over total volume (BV/TV) for the trabecular and cortical bones were determined by defining the volumes of interest (VOI) over a range of 5.63 mm starting from the growth plate. For the imaging analysis shown in Figures 2 and 4, the time axis was based on the post-detection days, ranging from 1 to 10, with day 1 being the time of the

first detection of a bone tumor by MRI. This normalization was performed to reduce the inter-individual variations.

Statistical analyses

The von Frey and dynamic weight-bearing data were analyzed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. The Spearman non-parametric correlation test was used to compare the behavioral, MRI and μ CT data because normality could not be assumed (failed KS test with Dallal-Wilkinson-Lillie for the p value and visual histogram distributions). Linear and non-linear regressions were displayed on graphs as guides to the eye. The non-linear model used for Figures 3 and 6 was either a one- or two-phase decay described by the following equation (provided by Graphpad Prism 5.0 software): $Y = \text{Plateau} + \text{Spanfast} \cdot \exp(-K_{\text{Fast}} \cdot X) + \text{Spanslow} \cdot \exp(-K_{\text{Slow}} \cdot X)$, where K_{Fast} and K_{Slow} (K for a one-phase decay) are the rate constants describing the speed at which the dependent variable is decreasing.

Results

Temporal development of behavioral nociceptive responses following the implantation of breast carcinoma cells in the femur

We monitored the onset of pain and its evolution on a regular basis during the first three weeks following the inoculation of the syngeneic mammary tumor cell line MRMT-1 into the femoral bone. We first assessed tactile allodynia using the von Frey test (Fig. 1A). Mechanical hypersensitivity was demonstrated on day 14 post-surgery by a reduced paw withdrawal threshold (PWT) compared with the contralateral hind paw (36.7 ± 2.0 g vs. 42.1 ± 1.3 g, respectively; $p \leq 0.05$). Allodynia progressively developed until day 21, reaching a 45% decrease of the mechano-nociceptive threshold (23.3 ± 1.4 g vs. 42.6 ± 1.5 g; $p \leq 0.001$). Tumor-bearing rats displayed no change in their withdrawal thresholds on their contralateral hind paw (Fig. 1A).

The measurement of the weight-bearing deficits in freely moving rats has recently been proposed as a potential endpoint to the quality of life assessment [42]. Therefore, we evaluated the effects of tumor-induced bone remodeling on the changes in weight bearing using Dynamic Weight Bearing technology (DWB; Fig. 1B). Our results revealed that the weight borne by the tumor-implanted limb had decreased significantly at day 15 ($18.6 \pm 3.6\%$) when compared with the weight borne at day 11 ($30.7 \pm 1.5\%$) (Fig. 1B). The maximal alteration of the weight distribution was reached 21 days following the cancer cell inoculation ($38.2\% \pm 1.3\%$ on the contralateral paw vs. $16.6\% \pm 6.1\%$ on the ipsilateral paw; $p \leq 0.001$). Note that the rats transferred their ipsilateral hind paw weight mainly to the forepaws and consequently decreased their exploratory behaviors, grooming and rearing (data not shown). No significant difference was noted for the 21-day period between the sham animals and the contralateral hind paw of the cancer rats.

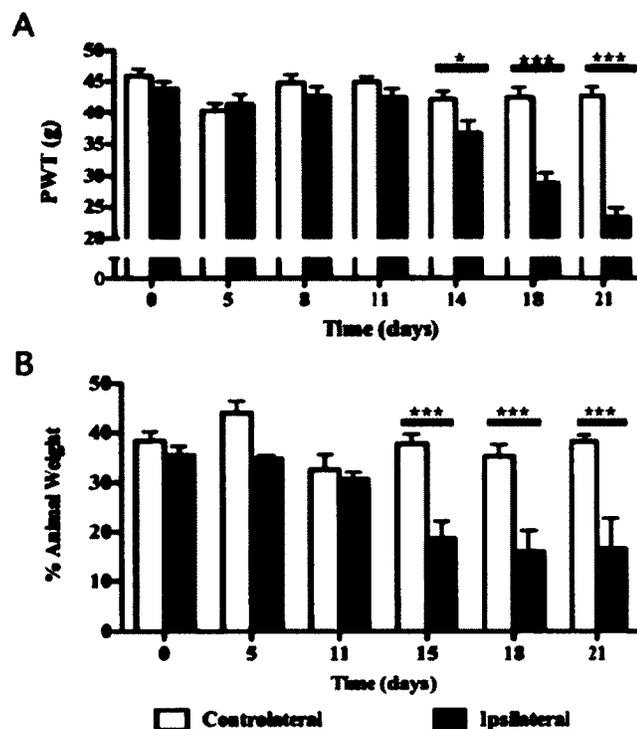


Figure 1. Behavioral evaluation of bone cancer pain over time. A) Allodynia is determined using the von Frey test following tumor implantation. In cancer-bearing rats, the paw withdrawal threshold (PWT) decreases progressively from days 11-14 in response to innocuous stimulations ($n = 10$). B) Quantification of dynamic weight bearing in the implanted animals, expressed as the percentage of animal weight ($n = 7$). A significant difference in the weight distribution on the ipsilateral paw is observable from day 15 until reaching its maximum level at day 21, with a decrease of 56% in the weight borne. The contralateral paw remains unaffected throughout the behavioral testing. The asterisks denote a significant difference from the contralateral paw; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Tumor growth monitoring using MRI

We first monitored the tumor progression by scanning the rats at short intervals to capture the tumor growth in the femur at early stages of development. The volume of the detected tumor was analyzed as a function of the post-detection time to normalize the inter-individual variability in tumor development. For example, the sensitivity of the sagittal gadolinium-enhanced T_1 -weighted MRI allowed us to detect intra-osseous tumors smaller than 10 mm^3 in some cancer-bearing rats. These small foci were considered to be day 1 post-detection and corresponded to days 8 to 10 post-implantation of MRMT-1 cancer cells. The bone tumor development and structural damages to the femur were

further monitored for up to 10 days post-detection (Figure 2A). At day 0, the MR images of the marrow and trabecular bone all displayed uniform signal intensities. The sharp but hypointense cortical line was continuous. At day 1 post-detection, the MRI revealed an increased signal intensity in the area immediately surrounding the injection site, thereby revealing the success of the tumor implantation and growth in the medullary cavity. During days 3 to 5, the carcinoma spread into the medullary canal, progressively reaching the proximal metaphysis to the implantation site. At this stage, the tumor volumes ranged from 30 to 40 mm³ (Figure 2B). On day 7 post-detection, a hyperintense signal in the diaphyseal bone revealed deep infiltration. Furthermore, the contrast-enhanced T_1 -weighted images revealed the presence of periosteal tumor extension across the irregular and blurred cortical bone line near the proximal metaphysis. Note that after dissection, we noticed that the tumor remained confined to the periosteal compartment (data not shown). This mechanical distension and stretching of the periosteum is known to contribute to the development of pain [19, 43]. As previously described [41], the hypointense signal detected at day 10 post-detection in the medullary cavity is the consequence of the presence of necrotic cells. The first half of the growth curve shows a linear progression of the carcinoma, consecutive to the implantation and setting of the cells in their new environment (n = 19; Figure 2B). Then, the curve takes an exponential profile from day 8, which is the stage where the periosteal signal is captioned.

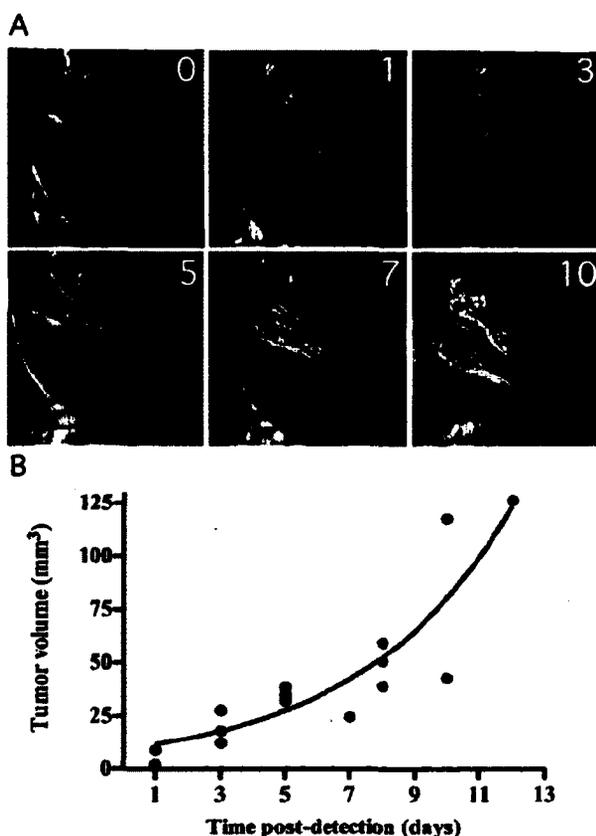


Figure 2. Estimation of tumor volume using contrast-enhanced (Gd-DTPA) MRI. A) Enhanced contrast is observed from day 1 (post-detection) in a small area adjacent to the injection site. The tumor size then progresses and invades the distal medullar channel without altering the cortical integrity (days 3 and 5). At a later stage, the tumor emerges from the bone, expanding mainly outside the bone between the cortical line and periosteal membrane. Meanwhile, the contrast intensity is decreased in the medullar channel as the necrosis spreads throughout the channel. In addition, the cortical line is blurred in thinner regions. B) Each animal in which a tumor is detected is monitored at several time points and reported with respect to post-detection time to reduce the variability. The tendency curve shows the exponential growth pattern.

Correlation between tumor growth and pain-related behaviors

We verified the potential relationship between tumor size and pain-related behavioral modifications by performing the von Frey and DWB tests before the acquisition of the T1-weighted contrast enhanced MR images (Figure 3). We observed a strong negative correlation between tumor volume and the amplitude of the mechanical hypersensitivity (Figure 3A) throughout the experiment ($r = 0.7857$; $p = 0.0005$). The evolution of these parameters displayed a two-phase decay in which the allodynia was

maximal at volumes greater than 80 mm^3 . The rate constant (k) of $1.34\text{E}10^6$ (fast) confirms the fast onset of allodynia at an early stage. The rate stabilizes ($k = 0.04$) at approximately 10% of the maximal size the tumor will reach. Similarly, a moderate correlation was revealed between the tumor volume and weight bearing ($r = 0.6593$; $p = 0.01$) (Figure 3B). This time, the variation was extrapolated in a one-phase decay model with a slower rate constant ($k = 0.03$). The results suggest that the early onset of pain is an indicator of tumor progression. To verify this observation, we examined whether allodynia and postural impairment could be markers of tumor development at an initial stage (Figure 3C). For a tumor of less than 10 mm^3 corresponding to day 1 post-detection, no behavioral difference between the ipsi- and contralateral paws was observed. We thus concluded that imaging can systematically reveal the presence of a tumor before the onset of pain in our model.

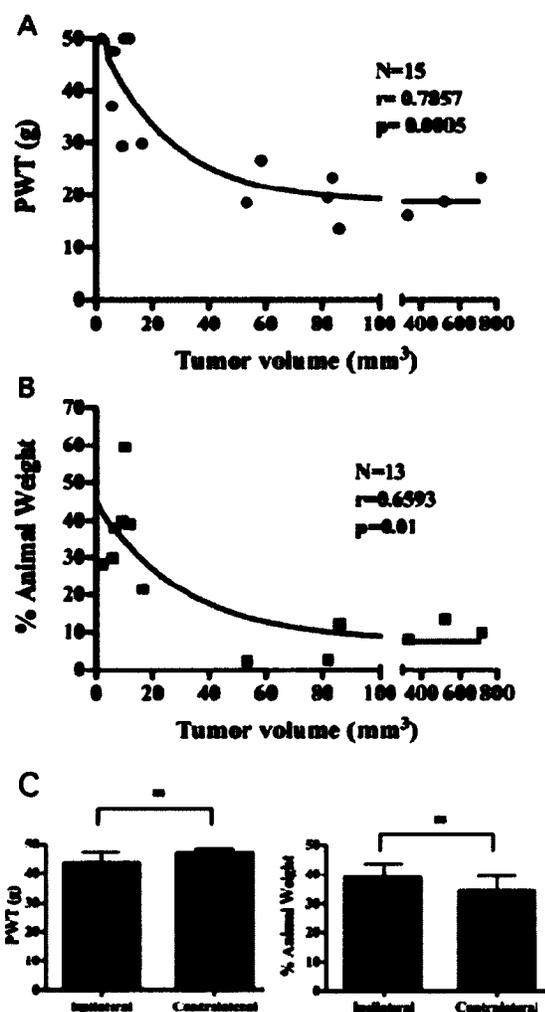


Figure 3. Correlation between the tumor volume and behavioral measurements of bone cancer pain. A) The estimated tumor volume is inversely correlated with the paw withdrawal threshold (PWT). B) The same pattern is observed when the volume is correlated with the percentage of animal weight borne by the affected paw. Both parameters stabilize at high tumor volumes. C) The comparison between the ipsilateral and contralateral paws of the cancer-bearing animals shows no significant difference at day 1 post-detection, confirming the assumption that the tumor was detected using MRI before the onset of pain.

Bone resorption monitoring with μ CT

Advanced breast cancer commonly disseminates and leads to osteolytic bone metastases [1]. To further quantify the structural changes of the affected bones, we

therefore performed post-mortem micro-computed tomography (μ CT) analyses at four time points (days 1, 3, 7 and 10 post-detection) after cancer cell injection and in the sham animals ($n = 3-4$). The bone samples were collected from the animals previously imaged in the MRI (c.f. Figure 3). The reconstructed 3-D μ CT images of the carcinoma-implanted femurs showed the progressive tumor-induced osteolysis (Figure 4A). In contrast to the intact bone architecture of the sham animals, the cancer-bearing rats exhibited severe bone lesions, as represented by the decrease in the trabecular and cortical morphometric parameters (Figure 4B, C). At day 1 post-detection, the trabecular modifications already occurred, while the bone cortex remained mainly unaffected. Indeed, the trabecular bone volume/tissue volume ratio progressively decreased by 70% between days 1 and 10 (Figure 4B). The same trend was observed for the cortical bone, with the BV/TV decreasing significantly by more than 95% on day 10 compared with day 1 (Figure 4C). However, cortical degradation was only detected on day 7. At that stage, cell leakage through the cortex is possible because massive osteopenia was revealed in several areas of the metaphysis. Accordingly, tumor growth outside the cortex was monitored in the MRI on days 7-10 post-detection. Thus, the trabecular and cortical bone degradation profiles are different at a late stage. Indeed, the trabecular BV/TV stabilizes between days 7 and 10 (with only an 8.8% decrease), whereas the cortical bone loss is maximal during the same period. Nearly 90% of the remaining bone cortex on day 7 was resorbed before the last experimental day (day 10). Significant differences were observed at days 7 and 10 post-detection at the trabecular level compared with the sham animals and at day 10 at the cortical level ($p \leq 0.05$).

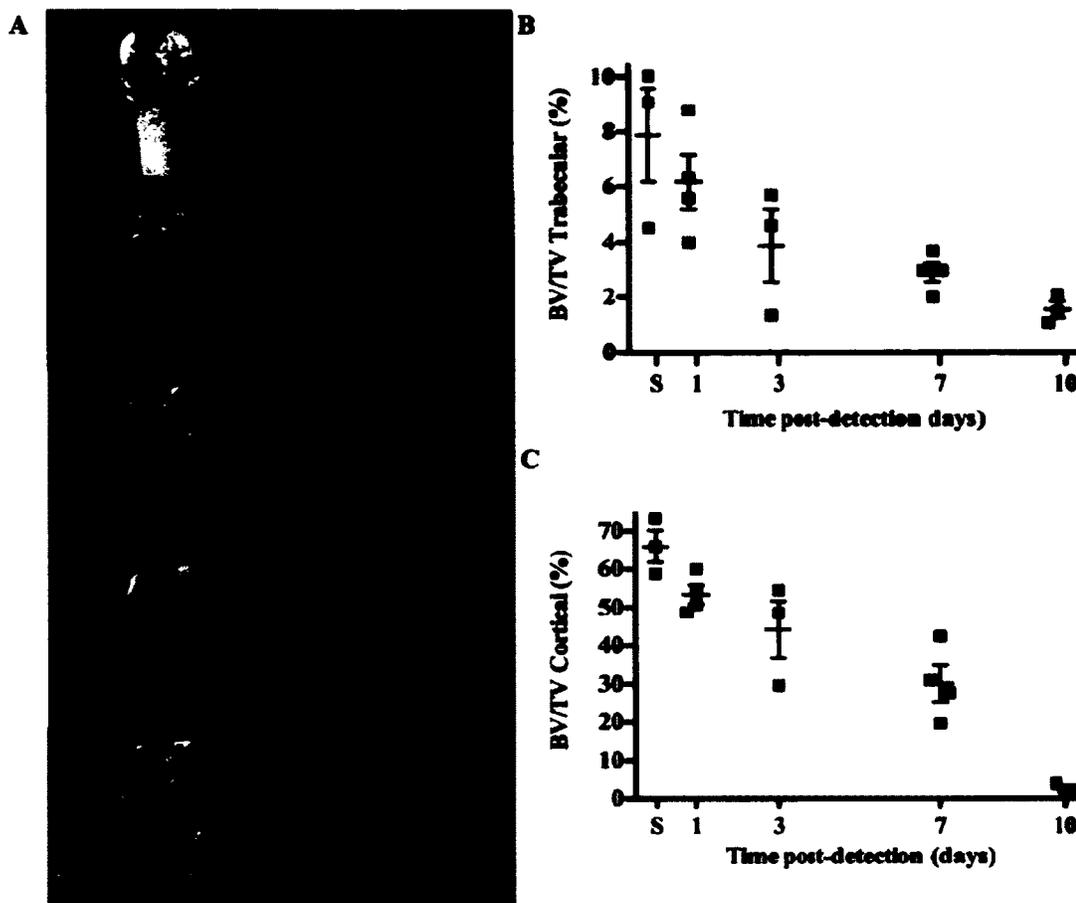


Figure 4. μ CT analysis of sham and tumor-bearing rat femurs. A) Typical reconstruction of the sham-operated femur and cancer-bearing bones at days 1, 3, 7 and 10 post-detection. A well-organized trabecular structure and smooth cortical surface are observed on the sham-operated bone. Conversely, the trabecular is slightly degraded at day 1 of tumor development (post-detection), whereas the cortex remains unaffected at that stage. However, the cortical bone is partially resorbed and the trabecular architecture is clearly lost at days 3 and 7. At day 10, the tumor has resorbed most of the cortical bone and has expanded beyond the bone compartment. B-C) The BV/TV ratios for the trabecular and cortical bone decrease over time. The trabecular BV/TV tends to stabilize between days 7 and 10 post-detection, whereas the cortical degradation is maximal during this period.

Correlation between bone resorption and tumor-induced pain

We further examined whether the behavioral deficits were correlated with bone architecture alterations. In the animals used for the behavioral and imaging experiments, a strong positive correlation was shown between the trabecular bone content and allodynia (Figure 5A; $r_s = 0.73$; $p = 0.002$). The Spearman correlation was stronger against the

cortical bone content alteration (Figure 5B; $r_s = 0.81$; $p = 0.0003$), suggesting that these parameters could be used as potential markers for the clinic. However, the correlations appeared to be moderate in terms of a weight-bearing deficit either when verifying against the trabecular content (Figure 5C; $r_s = 0.64$; $p = 0.03$) or the cortical content (Figure 5D; $r_s = 0.69$; $p = 0.02$). Overall, the trend in the data suggests that a one percent decrease in the trabecular BV/TV ratio results in a drop of 4.5 ± 1.0 g in the PWT and $4.9 \pm 1.7\%$ in the ipsilateral paw load. Conversely, a decrease of one percent in the cortical BV/TV is less aggressive on the behavioral variables, reflected in variations of 0.5 ± 0.1 g (PWT) and $0.6 \pm 0.2\%$, respectively.

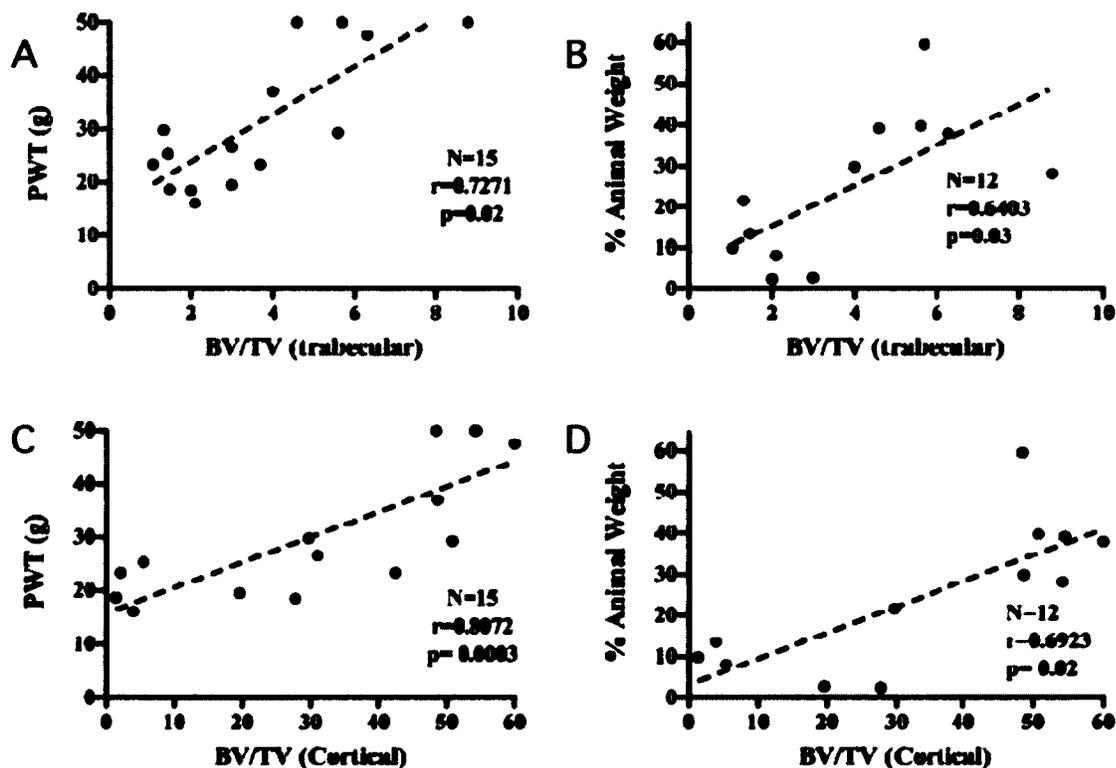


Figure 5. Correlation between bone resorption and pain-related behaviors. A-B) A positive correlation is observed between the trabecular or cortical BV/TV ratios and PWT. C-D) A significant correlation is also observed when comparing the trabecular or cortical BV/TV with the % of animal weight borne by the tumor-bearing paw.

Correlation between tumor volume and bone resorption

Next, we verified the correlation between the growth of the tumor and the extent of the BV/TV ratio decrease (Figure 6). We found a strong negative correlation against both the trabecular (Figure 6A; $r_s = 0.82$; $p = 0.0003$) and cortical (Figure 6B; $r_s = 0.86$; $p = 0.0001$) bone content. The decay curve shows that the trabecular bone volume was affected at an early stage of tumor development and remained at a low level thereafter. The cortical bone BV/TV ratio, however, decreased more in proportion to the tumor growth. Indeed, the decay rate constants were 133 times higher for the trabecular content than for the cortical content. These results were in line with the observations made in the MRI, in which the tumor growth spread first in the medullary canal, replacing the marrow and trabecular bone while progressively degrading the compact cortex for an ultimate periosteal expansion at a late stage.

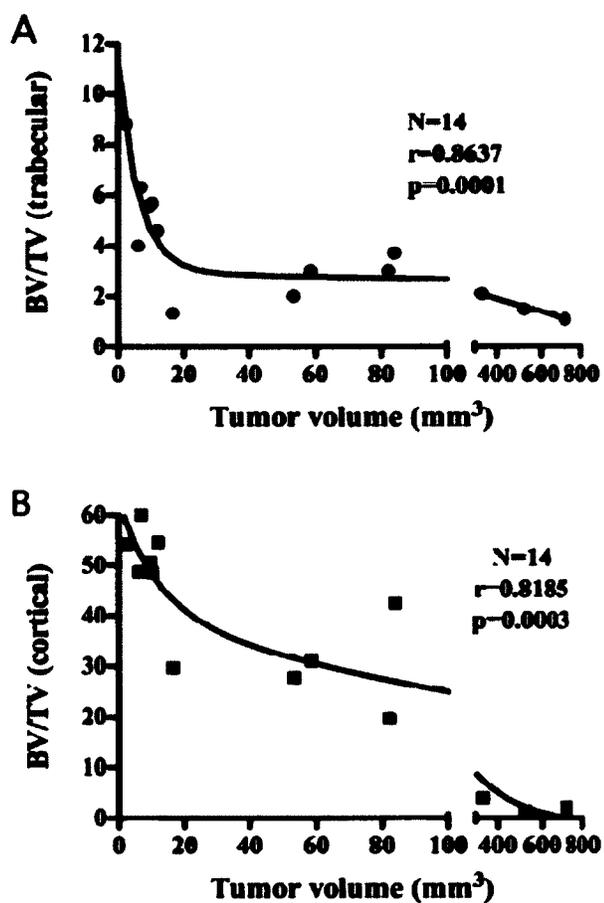


Figure 6. Correlation between the estimated tumor volume and bone remodeling. A) The tumor volume is significantly correlated with the trabecular BV/TV. This parameter decreases drastically at volumes smaller than 20 mm³. B) In cancerous bones, the tumor volume is correlated with the cortical BV/TV with decreasing BV/TV throughout the tumor development.

Discussion

Bone metastases lead to a painful condition for which available treatments have limited efficacy. Opioids have remained the gold standard for advanced cancer pain management for the last 25 years, despite their many undesirable effects [44]. For example, morphine has been associated with opioid-induced hyperalgesia, tolerance and constipation [45]. Additionally, King and colleagues reported deleterious effects of morphine on bone integrity in a mouse cancer model [46]. This effect appeared to be mediated through the activation of osteoblasts, increasing the risk of bone fractures. It has become clear that new treatments are needed to improve cancer patients' quality of life, especially given recent increases in post-diagnosis life expectancy [4]. Additionally, scientists and clinicians are highly receptive to new tools or methodologies to improve the monitoring of not only the analgesic effects of treatments but also other related parameters, such as tumor growth and bone remodeling [28, 38, 39]. In that respect, the use of advanced non-invasive imaging modalities appears to be a good solution to visualize various aspects of the bone environment in terms of soft-tissue content, density, or metabolism [29, 30]. The aim of this study was thus to evaluate the correlation between MRI or μ CT imaging and pain-related behaviors in an animal model of bone cancer.

Previous population-based cohort studies have highlighted the high incidence of skeletal-related events among breast cancer patients with bone metastases following the first year of a bone metastasis diagnosis [8]. Therefore, diagnostic imaging modalities are important because the early identification of bone metastases could lead to changes in patient management and quality of life. Among the technologies used to image bone tumors, MRI seems to yield a reliable diagnostic outcome in terms of sensitivity and specificity [35, 47]. Indeed, the high soft tissue resolution of MRI provides detailed images of bone tumors and bone marrow lesions. In addition to clinical practice, MRI has also been used for the early detection of bone metastases in animal models [48, 49]. Furthermore, MRI appears to be efficient for monitoring tumor progression in correlation with histological and biochemical parameters, such as osteoclastic activity or serum-specific antigen levels [50, 51]. More recently, the evaluation of different treatments targeting bone

tumors has been performed with imaging techniques, such as diffusion weighted- and dynamic contrast-enhanced MRI [35, 52, 53].

Although bone remodeling and pain appear to be intimately linked, the relationship between tumor growth-induced bone resorption and pain-like behaviors has been poorly investigated. Although it is most commonly detected in advanced stages, patients can often present with bone pain as the first symptom of cancer, particularly in breast cancer [11]. Therefore, establishing such a relationship would increase our comprehension of the effect of an anti-tumorigenic drug on both cancer- and pain-related events. For example, the selective COX-2 inhibitor, MF tricyclic, was shown to reduce tumor growth and bone damage in addition to inducing an analgesic effect [22]. A similar case was reported with zoledronate, a bisphosphonate tested in a rat cancer model [54]. However, for those drugs, the analgesic effect was determined at a late stage only, and the timely effect of the drug on both variables was not determined.

The model used in the present study mimics the development of a bone metastasis that could occur after the dissemination of tumor cells to the bone through blood circulation. However, the surgical procedure bypasses the extravasation of cancer cells from the primary organ to the bone. Models of the orthotopic implantation of cancer cells to a primary site or systemic dissemination through intravenous or intracardiac administration have also been used in the past to mimic the holistic context of metastatic cancer. Although these models have been very helpful in elucidating the underlying mechanism involved in metastatic processes, they are of limited usefulness for specific pain investigations. Indeed, pain evaluation in rodents is mostly based on the differences between an injured paw and its healthy counterpart. Evaluating pain in an animal with numerous bone lesions would thus be problematic, particularly with the potential colonization of peripheral organs and tissues. That being said, more common cell types have been used in several contexts, which allows for a comparison of the bone lesions induced. As an example, human MDA-MB-231 mammary cells that are injected intracardially induce bilateral long bone metastasis 30 to 55 days after inoculation [55, 56]. The radiological and histological aspects of these tumors appeared to be very similar to those from bone-inoculated cells [19, 33]. From the moment of the diagnosis of bone

tumors (28 days in the case of MDA-MB-231 cells directly administered into the bone), the time course of tumor development was also very similar. We are thus confident that our model of tumor implantation in the bone, without the holistic metastatic context, is still relevant and allows for the efficient study of bone metastasis-induced pain. Additionally, the timeline with which the tumor grows is dependent on the chosen implantation site and the number of cells injected. However, with MRMT-1 and NCTC2472 cells, the injection of a higher number of cells has been demonstrated to trigger pain at an earlier stage without significantly modifying the severity or rapidity of the evolution of the symptoms in the animals [14, 16, 57].

In the present study, our MRI results show moderate to strong correlations and a two-phase profile between pain and cancer growth. Indeed, the variation in pain is greater at an early stage of tumor growth but tends to stabilize thereafter. This trend may be attributable to an early modification in the bone innervation and vasculature. The MRI shows the initial infiltration of the medullary canal, affecting the red marrow. This two-phase profile is also supported by our μ CT data, which revealed a rapid drop in the BV/TV trabecular ratio at the same time. Meanwhile, a progressive degradation of the cortical bone slowly creates an access to the cortex and periosteal compartment. Recently, nerve sprouting was shown to be associated with cancer pain, especially at the periosteal level [19, 20, 58, 59]. Nerve sprouting occurs when the bone integrity is compromised and when the cancer cells act directly on the periosteal membrane [18, 60]. On the other hand, advanced tumor growth was shown to induce nerve endings injury resulting in a decrease in CGRP/NF200-positive innervation in bone marrow and cortex [60]. Nerve injury induced the expression of several markers of central sensitization including neuronal damage marker ATF-3 [41, 61, 62]. Both sensory and sympathetic fibers are implicated and the proliferation of nerve endings has been compared to neuroma, and involved in pain [59, 63]. MR images showed enhanced contrast at the bone periphery as early as day 5 post-detection. Therefore, the occurrence of a striking onset of mechanical hypersensitivity at early tumor development is not surprising. After this early pain onset, allodynia progressed slowly, even if the tumor dimension expanded from 60 to more than 700 mm³. This finding supports the hypothesis that the bone microenvironment is central to the

genesis of tumor-induced pain. This observation also raises the possibility that growth in the periosseous tissues is not a major factor in ongoing pain. However, we hypothesize that the distension of the periosteal compartment could be responsible for spontaneous pain events at the late stages. Nevertheless, the evaluation of the role of periosseous tissue compared to bone remains a challenge to evaluate in pre-clinical settings. The other question that remains is whether a reduction in tumor size would result in less pain. Radiotherapy has been associated with pain relief in animal models [64]. We believe this outcome should be evaluated in the future with a protocol such as the one we are proposing here.

Metastatic breast cancer in bones also leads to other severe pain events, such as the fracture of a weight-bearing limb. Indeed, lytic lesions can result in a 60-90% reduction in bone strength, which increases the risk of pathological fractures [65]. Early symptoms of pain or functional compromise can thus reveal an impending emergency, requiring proactive therapeutic intervention. Determining the extent of the osteolytic lesions by μ CT therefore represents a useful approach to detect any structural defects in the cortical and trabecular content or to visualize bone marrow metastases [47]. The morphological analyses of the femoral bone by μ CT revealed significant linear correlations between the BV/TV ratios at the cortical or trabecular levels and touch-evoked pain or weight-bearing deficits. These results are supported by a previous study demonstrating a link between tumor growth-induced bone destruction and behavioral pain manifestations [66].

It is now established that bone remodeling provokes the release of cytokines and growth factors that stimulate nociceptors directly [13]. Additionally, the increased osteoclastic activity in the vast majority of bone metastases secondary to breast cancer creates an acidic microenvironment that activates transient receptor potential channels and acid-sensing ion channels, increasing nociceptive firing [24, 67, 68]. Furthermore, nerve endings in the bone cortex become exposed to factors released by the tumor and the bone matrix after resorption. Marketed drugs counteracting the osteolytic hyperactivity, such as bisphosphonates and RANKL pathway inhibitors, proved useful in pre-clinical and clinical contexts for reducing the incidence of skeletal-related events and collagen blood levels and at increasing survival rates [69]. The effects of these drugs on pain-related

behaviors are, however, rarely investigated. The progressive and timely decrease in the cortical/trabecular bone volume and relationship to pain make them relevant variables to investigate in drug screening. Therefore, anti-resorptive treatments would be expected to alleviate or reduce pain manifestations in an indirect way by slowing down bone remodeling. Accordingly, there is evidence that anti-resorptive drugs indirectly reduce pain through the inhibition of osteolysis [70, 71]. The nitrogen-containing bisphosphonate zoledronate, increasingly considered as an adjuvant in cancer therapy in addition to its anti-resorptive action [72], could fit the model we described here. Some cancer treatments cannot be excluded as having analgesic properties in addition to their primary antineoplastic action.

Our approach will also be improved in the future with PET experiments using a sodium fluoride tracer to assess bone metabolism at the time of the behavioral testing. Other bone-specific tracers are being developed to monitor the metabolism in bone resorption. Anderson et al. recently published a study on the use of an $\alpha\nu\beta_3$ -targeted radiolabeled tracer that allows the accurate assessment of the relative number of osteoclasts *in vivo* [73]. Such a highly specific approach could easily be translated to bone cancer pain because osteoclast proliferation and activation are major factors in the development and maintenance of bone pain.

Conclusion

The continued medical care of patients who experience skeletal-related events represents an important health care cost that requires prevention strategies. Indeed, a one-year study of the incidence of skeletal-related events revealed that half of the patients with bone metastases each cost an average of \$12,500 for only one event [74]. Therefore, the strong correlation between pain-related behaviors, tumor progression and bone remodeling revealed here suggests that pain and weight-bearing deficits are important indicators of the presence of bone metastases. Thus, patients reporting a change in pain intensity would need to undergo a closer examination to evaluate the disease progression. Additionally, MRI and μ CT imaging modalities could accurately predict disease progression and be beneficial for monitoring the response to antitumor therapy or analgesic

treatments. Finally, the fact that the pain-related behaviors are systematically detected after the appearance of the tumor in our protocol raises interest in a prophylactic analgesic treatment to prevent bone cancer pain onset. These elements are all expected to improve the quality of life for patients dealing with advanced stage cancer.

Acknowledgements:

This work is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Cancer Research Society (CRS) awarded to P.S. It was also initiated by financial support from the Quebec Bio-Imaging Network and the network for Oral and Bone Health Research. L.D.-S. is the recipient of a Frederick Banting and Charles Best CIHR scholarship and is a trainee supported by the Canadian Arthritis Network. M.L. is the Canadian Research Chair in Magnetic Resonance Imaging. P.S. is a CIHR new investigator and director of the Sherbrooke's Neuroscience Center. P.S. and M.L. are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Lebel. We are also grateful to Nathalie Carrier at the Centre de Recherche Clinique Etienne-Lebel for her help with the statistical analysis.

References

1. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK (2011) Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11 6): 411-25
2. Coleman RE (2006) Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12 20 Pt 2): 6243s-9s
3. Suva LJ, et al. (2011) Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol* 7 4): 208-18
4. Jemal A, et al. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60 5): 277-300
5. Trinkaus M, et al. (2009) Examination of the mechanisms of osteolysis in patients with metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 21 5): 1153-9
6. Rove KO, Crawford ED (2009) Metastatic cancer in solid tumors and clinical outcome: skeletal-related events. *Oncology (Williston Park)* 23 14 Suppl 5): 21-7
7. Coleman RE (1997) Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80 8 Suppl): 1588-94
8. Jensen AO, et al. (2011) Incidence of bone metastases and skeletal-related events in breast cancer patients: a population-based cohort study in Denmark. *BMC Cancer* 11: 29
9. van den Beuken-van Everdingen MH, et al. (2007) Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. *Ann Oncol* 18 9): 1437-49
10. Kirou-Mauro AM, et al. (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 1): 77-84
11. Paes FM, et al. (2011) Radiopharmaceuticals: when and how to use them to treat metastatic bone pain. *J Support Oncol* 9 6): 197-205
12. Pacharinsak C, Beitz A (2008) Animal models of cancer pain. *Comp Med* 58 3): 220-33
13. Jimenez-Andrade JM, et al. (2010) Bone cancer pain. *Ann N Y Acad Sci* 1198: 173-81
14. Schwei MJ, et al. (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 24): 10886-97

15. Mao-Ying QL, et al. (2006) A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345 4): 1292-8
16. Medhurst SJ, et al. (2002) A rat model of bone cancer pain. *Pain* 96 1-2): 129-40
17. Zhang RX, et al. (2005) Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain* 118 1-2): 125-36
18. Halvorson KG, et al. (2006) Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. *Clin J Pain* 22 7): 587-600
19. Bloom AP, et al. (2011) Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. *J Pain* 12 6): 698-711
20. Jimenez-Andrade JM, et al. (2010) Pathological sprouting of adult nociceptors in chronic prostate cancer-induced bone pain. *J Neurosci* 30 44): 14649-56
21. Jimenez-Andrade JM, et al. (2011) Preventive or late administration of anti-NGF therapy attenuates tumor-induced nerve sprouting, neuroma formation, and cancer pain. *Pain* 152 11): 2564-74
22. Sabino MA, et al. (2002) Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction, and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 62 24): 7343-9
23. Fox A, et al. (2004) Anti-hyperalgesic activity of the cox-2 inhibitor lumiracoxib in a model of bone cancer pain in the rat. *Pain* 107 1-2): 33-40
24. Nagae M, Hiraga T, Yoneda T (2007) Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. *J Bone Miner Metab* 25 2): 99-104
25. El Mouedden M, Meert TF (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 1): 30-40
26. Sevcik MA, et al. (2004) Bone cancer pain: the effects of the bisphosphonate alendronate on pain, skeletal remodeling, tumor growth and tumor necrosis. *Pain* 111 1-2): 169-80
27. Tripathy D, Body JJ, Bergstrom B (2004) Review of ibandronate in the treatment of metastatic bone disease: experience from phase III trials. *Clin Ther* 26 12): 1947-59

28. Jimenez Andrade JM, Mantyh P (2010) Cancer Pain: From the Development of Mouse Models to Human Clinical Trials. *Translational Pain research: From Mouse to Man. Frontiers in Neuroscience*, 2011/09/02 edn. CRC Press, Boca Raton, FL
29. Costelloe CM, et al. (2009) Imaging bone metastases in breast cancer: techniques and recommendations for diagnosis. *Lancet Oncol* 10 6): 606-14
30. Houssami N, Costelloe CM (2012) Imaging bone metastases in breast cancer: evidence on comparative test accuracy. *Ann Oncol* 23 4): 834-43
31. Hsu WK, et al. (2008) Characterization of osteolytic, osteoblastic, and mixed lesions in a prostate cancer mouse model using 18F-FDG and 18F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 49 3): 414-21
32. Zitzmann-Kolbe S, et al. (2010) D-18F-fluoromethyl tyrosine imaging of bone metastases in a mouse model. *J Nucl Med* 51 10): 1632-6
33. Cheng C, et al. (2011) Evaluation of treatment response of cilengitide in an experimental model of breast cancer bone metastasis using dynamic PET with 18F-FDG. *Hell J Nucl Med* 14 1): 15-20
34. Merz M, et al. (2011) Sorafenib tosylate and paclitaxel induce anti-angiogenic, anti-tumour and anti-resorptive effects in experimental breast cancer bone metastases. *Eur J Cancer* 47 2): 277-86
35. Bauerle T, et al. (2010) Drug-induced vessel remodeling in bone metastases as assessed by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging and vessel size imaging: a longitudinal in vivo study. *Clin Cancer Res* 16 12): 3215-25
36. Grankvist J, et al. (2012) MRI and PET/CT of patients with bone metastases from breast carcinoma. *Eur J Radiol* 81 1): e13-8
37. Walkington L, Coleman RE (2011) Advances in management of bone disease in breast cancer. *Bone* 48 1): 80-7
38. Coleman RE, McCloskey EV (2011) Bisphosphonates in oncology. *Bone* 49 1): 71-6
39. Aapro MS, Coleman RE (2012) Bone health management in patients with breast cancer: Current standards and emerging strategies. *Breast* 21 1): 8-19
40. Eisenhauer EA, et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45 2): 228-47

41. Doré-Savard L, et al. (2010) Behavioral, Medical Imaging and Histological Features of a New Rat Model of Bone Cancer Pain. *PLoS One* 5 10): e13774
42. Tetreault P, et al. (2011) Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav* 104 3): 495-502
43. Castaneda-Corral G, et al. (2011) The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A. *Neuroscience* 178: 196-207
44. Mercadante S, Fulfaro F (2007) Management of painful bone metastases. *Curr Opin Oncol* 19 4): 308-14
45. Angst MS, Clark JD (2006) Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 104 3): 570-87
46. King T, et al. (2007) Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. *Pain* 132 1-2): 154-68
47. Hamaoka T, et al. (2004) Bone imaging in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 22 14): 2942-53
48. Gouvain KM, et al. (2005) MRI detection of early bone metastases in b16 mouse melanoma models. *Clin Exp Metastasis* 22 5): 403-11
49. Wang L, et al. (2008) MRI and hybrid PET/CT for monitoring tumour metastasis in a metastatic breast cancer model in rabbit. *Nucl Med Commun* 29 2): 137-43
50. Kundra V, et al. (2007) In vivo imaging of prostate cancer involving bone in a mouse model. *Prostate* 67 1): 50-60
51. Murakami K, et al. (2008) Correlation between high field MR images and histopathological findings of rat transplanted cancer immediately after partial microwave coagulation. *Magn Reson Med Sci* 7 3): 105-12
52. Reichardt W, et al. (2009) Diffusion-weighted imaging as predictor of therapy response in an animal model of Ewing sarcoma. *Invest Radiol* 44 5): 298-303
53. Rozel S, et al. (2009) Synergy between anti-CCL2 and docetaxel as determined by DW-MRI in a metastatic bone cancer model. *J Cell Biochem* 107 1): 58-64
54. Walker K, et al. (2002) Disease modifying and anti-nociceptive effects of the bisphosphonate, zoledronic acid in a model of bone cancer pain. *Pain* 100 3): 219-29

55. Shah M, et al. (2012) An MMP13-selective inhibitor delays primary tumor growth and the onset of tumor-associated osteolytic lesions in experimental models of breast cancer. *PLoS One* 7 1): e29615
56. Holland PM, et al. (2010) Combined therapy with the RANKL inhibitor RANK-Fc and rhApo2L/TRAIL/dulanermin reduces bone lesions and skeletal tumor burden in a model of breast cancer skeletal metastasis. *Cancer Biol Ther* 9 7): 539-50
57. Svensson CI, et al. (2008) Role of p38 mitogen activated protein kinase in a model of osteosarcoma-induced pain. *Pharmacol Biochem Behav* 90 4): 664-75
58. Ghilardi JR, et al. (2011) Sustained blockade of neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC reduces non-malignant skeletal pain but not the maintenance of sensory and sympathetic nerve fibers. *Bone* 48 2): 389-98
59. Mantyh WG, et al. (2010) Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. *Neuroscience* 171 2): 588-98
60. Peters CM, et al. (2005) Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Exp Neurol* 193 1): 85-100
61. Sevcik MA, et al. (2005) Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain* 115 1-2): 128-41
62. Kaan TK, et al. (2010) Systemic blockade of P2X3 and P2X2/3 receptors attenuates bone cancer pain behaviour in rats. *Brain* 133 9): 2549-64
63. Ghilardi JR, et al. (2010) Administration of a tropomyosin receptor kinase inhibitor attenuates sarcoma-induced nerve sprouting, neuroma formation and bone cancer pain. *Mol Pain* 6: 87
64. Zwolak P, et al. (2008) Local irradiation in combination with bevacizumab enhances radiation control of bone destruction and cancer-induced pain in a model of bone metastases. *International journal of cancer* 122 3): 681-8
65. Hipp JA, Springfield DS, Hayes WC (1995) Predicting pathologic fracture risk in the management of metastatic bone defects. *Clin Orthop Relat Res* 312): 120-35

66. El Mouedden M, Meert TF (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 1): 109-19
67. Tong Z, et al. (2010) Tumor tissue-derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain. *PLoS One* 5 4): e10234
68. Yoneda T, et al. (2011) Involvement of acidic microenvironment in the pathophysiology of cancer-associated bone pain. *Bone* 48 1): 100-5
69. Lipton A, Jacobs I (2011) Denosumab: benefits of RANK ligand inhibition in cancer patients. *Curr Opin Support Palliat Care* 5 3): 258-64
70. Pantano F, et al. (2011) New targets, new drugs for metastatic bone pain: a new philosophy. *Expert Opin Emerg Drugs* 16 3): 403-5
71. Costa L, Major PP (2009) Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nat Clin Pract Oncol* 6 3): 163-74
72. Costa L, et al. (2011) Anticancer evidence for zoledronic acid across the cancer continuum. *Crit Rev Oncol Hematol* 77 Suppl 1: S31-7
73. Zheleznyak A, et al. (2011) Integrin alpha(v)beta (3) as a PET Imaging Biomarker for Osteoclast Number in Mouse Models of Negative and Positive Osteoclast Regulation. *Mol Imaging Biol* Aug 19: 1-9
74. Lage MJ, et al. (2008) The cost of treating skeletal-related events in patients with prostate cancer. *Am J Manag Care* 14 5): 317-22

Mammary Cancer Bone Metastasis Follow-up Using Multimodal Small-Animal MRI and PET Imaging

L'état des connaissances en matière d'oncologie a progressé de manière significative au cours des dernières décennies. Ainsi, l'espérance de vie des patients n'a fait qu'augmenter. Par contre, la colonisation d'un site distant par les cellules cancéreuses, en particulier au niveau des os, en toujours un facteur synonyme d'un mauvais pronostic. L'imagerie médicale joue un rôle important dans le diagnostic et le suivi des métastases osseuses. De plus, elle permet d'évaluer les effets des traitements administrés aux patients en contexte clinique et expérimental. Toutefois, l'utilisation de techniques d'imagerie anatomique et fonctionnelle avancées tels que l'imagerie par résonance magnétique et la Tomographie d'émission par positron est sous-représentée dans la recherche animale, tout particulièrement dans des modèles de métastases osseuse. Dans la présente étude, nous avons procédé à une caractérisation en profondeur d'un modèle murin de métastase osseuse dérivée d'un cancer mammaire. À l'aide d'une méthode innovante de co-registation IRM/TEP, nous avons observé à différents temps le développement de la tumeur osseuse. À l'aide de différents radio-traceurs, nous avons évalué différentes caractéristiques de cette tumeur. Sur le plan métabolique, nous avons observé un captage accru de ^{18}F -fluorodésoxyglucose dans la tumeur à partir du jour 15 suivant l'implantation des cellules cancéreuses dans le canal médullaire du fémur. Cet indicateur du métabolisme glucidique a été quantifié en tirant avantage de la co-registation IRM/TEP. En effet, le dessin des régions d'intérêt sur les images TEP a été réalisé de façon précise et reproductible à partir de la résonance magnétique. Ainsi, nous avons été en mesure de délimiter clairement la tumeur du tissu environnant en de l'œdème/inflammation. La même méthode a été appliquée avec l'acide aminé radio-marqué ^{11}C -méthionine. Nous avons aussi observé une augmentation du captage de ce traceur dans la tumeur. Par contre, l'amplitude des modifications enregistrées était plus importante pour la ^{11}C -Met que pour le ^{18}F -FDG. De plus, il est apparu clairement que la valeur de fixation normalisée (SUV) moyenne variait de façon plus importante en raison de la tumeur que la valeur maximale pour les deux traceurs. Ces observations viennent appuyer une littérature de plus en plus dense qui encourage le remplacement du SUV_{max} comme valeur de référence pour la détection d'une tumeur par des paramètres plus pertinents et plus sensibles tels que le $\text{SUV}_{\text{moyen}}$. De plus, nous faisons dans cette étude la première démonstration qu'un acide aminé radioactif peut être utilisé comme traceur pour la détection d'une métastase osseuse dans un modèle de rongeur et qu'il pourrait présenter certains avantages par rapport au ^{18}F -FDG. Par exemple, l'utilisation combinée de deux traceurs TEP couplés au ^{18}F - est impossible d'un point de vue logistique autant dans les études précliniques que dans une investigation clinique. Cette limitation ne permet donc pas l'utilisation du ^{18}F -NaF (un marqueur de remodelage osseux) et du FDG. Ce problème pourrait être contourné avec la MET et cette combinaison pourrait représenter le clé dans le suivi des traitements visant les métastases osseuses. L'imagerie multimodale présentée dans cette étude sera aisément transférable en clinique pour un meilleur suivi des métastases osseuses chez les patients cancéreux.

**Mammary Cancer Bone Metastasis Follow-up using Multimodal
Small-Animal MRI and PET Imaging**

Auteurs de l'article : Louis Doré-Savard, David A. Barrière, Danny Bélanger, Nicolas Beaudet, Luc Tremblay, Jean-François Beaudoin, Éric E. Turcotte, Roger Lecomte, Martin Lepage et Philippe Sarret

Statut de l'article : Soumis au *Journal of Nuclear Medicine*

Avant-propos : Cet article s'inscrit examine plus en profondeur la puissance des outils d'imagerie médicale que nous avons appliqués à notre modèle de cancer osseux. Nous avons innové avec l'utilisation de plusieurs traceurs TEP et d'une technique de co-registation IRM/TEP. Il s'agit à notre connaissance d'une première pour un modèle de cancer des os. J'ai réalisé toutes les chirurgies et participé à toutes les expérimentations dans cette étude. J'ai procédé à plus de 90% des analyses et j'ai également été un participant majeur dans le processus d'écriture de l'article. J'ai aussi eu un rôle à jouer dans le design des expériences.

Mammary Cancer Bone Metastasis Follow-up using Multimodal Small-Animal MRI and PET Imaging

**Louis Doré-Savard^{1,3*}, David A. Barrière^{1,3*}, Élora Midavaine^{1,3}, Danny Bélanger⁵,
Nicolas Beaudet^{1,3}, Luc Tremblay^{2,3,4}, Jean-François Beaudoin^{2,4}, Eric E. Turcotte^{2,4},
Roger Lecomte^{2,4}, Martin Lepage^{2,3,4} and Philippe Sarret^{1,3#}**

¹Département de physiologie et biophysique, ²Département de médecine nucléaire et radiobiologie, ³Centre des neurosciences de Sherbrooke, ⁴Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke, ⁵Département de radiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

*Both authors contributed equally to this work.

Running title: Characterization of bone metastasis using medical imaging.

Number of text pages: 36

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Number of words in abstract: 340

Corresponding author:

Philippe Sarret, Ph.D.
Département de physiologie et biophysique
Faculté de médecine et des sciences de la santé
Université de Sherbrooke
3001 12e Avenue Nord
Sherbrooke, Québec, Canada
J1H 5N4
Tel: (819) 820-6868 (#15760)
Fax: (819) 820-6887
Email: Philippe.Sarret@USherbrooke.ca

Keywords: ¹⁸F-NaF, ¹¹C-Methionine, PET, MRI, ¹⁸F-FDG

Abstract

Rationale: Despite tremendous progress in the management of breast cancer, the survival rate of this disease is still correlated with the development of metastases—most notably, those of the bone. Diagnosis of bone metastasis requires a combination of multiple imaging modalities. MRI remains the best modality for soft tissue visualization, allowing for the distinction between benign and malignant lesions in many cases. On the other hand, PET imaging is frequently more specific at detecting bone metastasis by measuring the accumulation of radiotracers, such as ^{18}F -sodium fluoride (NaF) and ^{18}F -fluoro-deoxyglucose (^{18}F -FDG).

Methods: After surgical implantation of mammary MRMT-1 cells in a rat femur, we performed minimally invasive imaging procedures at different time points throughout tumor development. The procedure consisted of sequential co-registered MRI/PET, using Gd-DTPA as a contrast agent for MRI and ^{18}F -FDG, ^{11}C -methionine (^{11}C -MET) and ^{18}F -NaF as molecular tracers for PET imaging. The animals were then euthanized, and complementary radiological and histological analyses were performed.

Results: In this preclinical study, we demonstrated that co-registered MR/PET imaging provides helpful information in a rat mammary-derived bone cancer model. First, MR imaging provided a high definition anatomical resolution that made the localization of bone resorption and tumor extension detectable between days 9 and 18 after the injection of cancer cells in the medullary channel of the femur. Indeed, the calculation of SUV_{mean} and SUV_{max} in bone and soft tissue regions, as defined from the Gd-DTPA contrast enhanced MR images, showed ^{18}F -NaF uptake modifications and increased ^{18}F -FDG or ^{11}C -MET uptake in the bone and surrounding soft tissues. ^{18}F -FDG and ^{11}C -MET were compared in terms of the magnitude of change in their uptake and variability. We observed that ^{11}C -MET SUV_{mean} variations in the tumor were more important than those of ^{18}F -FDG. We also found less inter-individual variations using SUV_{mean} as a quantitative parameter compared to SUV_{max} .

Conclusions: This preclinical evaluation demonstrated that an MR/PET co-registration protocol provided a powerful tool to evaluate bone tumor progression in a rat model of bone metastasis and that this protocol could be translated to improve the clinical outcome for metastatic breast cancer management.

Introduction

Despite the development of efficient surgical interventions, radiotherapy and chemotherapy regimens against primary tumors, the prognosis and survival rate of breast cancer patients are still correlated with the ability of the tumor to invade distant organ sites(1). Indeed, detection of bone metastases in breast cancer patients is paired with a 5-year mortality rate of 70%. Therefore, early detection of bone metastases and evaluation of early tumor response to chemotherapy remain challenging for researchers and clinicians(2). To date, staging of metastatic breast cancer is performed with minimally invasive imaging modalities, such as bone scintigraphy (BS), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and positron emission tomography (PET)(3). All of these imaging modalities provide valuable information for establishing a diagnosis and a prognosis but differ in terms of their sensitivity and specificity. Thus, the use of complementary imaging techniques is gaining popularity in clinical practice(4).

BS is still preferred for the detection of bone metastases(5). Indeed, BS detects bone-forming lesions, including those associated with benign conditions (local inflammation/infection, traumatism, osteodegenerative process, etc.)(6). However, poor sensitivity for multiple bone metastases, especially in the spine, often makes confirmation by other imaging modalities, such as CT or MRI, necessary (7). However, technological advances in the field of tracer synthesis and the improved availability of more efficient imaging techniques could offer an alternative to BS in the clinical settings. CT and MRI are two techniques that provide detailed anatomical information. CT is preferred for structural bone imaging, whereas MRI displays a better contrast resolution than CT for soft tissue and the spinal cord visualization and shows greater specificity for malignant *versus* benign lesions(8).

PET also displays excellent specificity and sensitivity(9). The use of radiotracers such as ^{18}F -sodium fluoride (^{18}F -NaF), ^{18}F -deoxyglucose (^{18}F -FDG), and ^{11}C -methionine (^{11}C -MET) are powerful tools to explore both bone and tumor metabolism. ^{18}F -NaF is frequently used to assess bone metabolism because of the affinity of the fluoride anion for bone. This tracer has been previously used in preclinical models and has proven to be

efficient for the characterization of osteolytic and osteoblastic lesions by measuring bone remodeling (10,11). It is now widely accepted as a marker for bone turnover modifications in skeletal tumors(12). ^{18}F -FDG and ^{11}C -MET are both radiotracers used to detect and determine the location and extent of malignancies by measuring changes in glucose and protein metabolism, respectively(9,13). To date, ^{18}F -FDG has been used extensively to characterize tumor progression in animal models(14). However, a limited number of studies have investigated the use of ^{18}F -FDG mammary-derived bone metastasis(10,11). Considering the extensive use of this radiotracer in clinical oncology, it is important to acquire more data from animal models of breast cancer metastasizing to bone. The use of ^{11}C -MET has been mainly validated in brain tumors. In these studies, the investigators took advantage of the low background level for the detection of insidious tumors in which glucose uptake was low. However, the utility of radiolabeled amino acids has not been evaluated in animal models of bone metastasis. Despite its high sensitivity, PET imaging provides limited anatomical information. Co-registration of PET imaging with CT offers high resolution of the bone anatomy and metabolism to detect metastases but does not allow for precise monitoring of soft tissue and tumor extension. MRI provides better soft tissue contrast, such that MRI/PET co-registration may facilitate better staging of bone metastases. It has been suggested that MRI/PET co-registration represents a better option for detecting and staging tumors in both animal and human studies(15).

The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) defines bone tumor response by the changes in lesion size only. Moreover, this response is normally assessed at the end of the treatment protocol. Researchers need to develop additional markers to measure treatment efficiency throughout the course of its application. Metabolic imaging may represent one avenue to address this issue, although further validation is necessary in animal models.

In our previous preclinical study, we showed that gadolinium-enhanced T_1 -weighted MRI and ^{18}F -NaF PET are suitable for the evaluation of metastatic burden in a rat model of mammary-derived bone tumor(16). These analyses combined the following information: 1) the state of tissue perfusion, 2) high resolution images of the lesion and 3)

bone metabolism in cancer-bearing bones. In the present study, we explored the capacity of MR/PET co-registration using glucose (^{18}F -FDG), protein (^{11}C -MET) and bone (^{18}F -NaF) metabolism markers to characterize our model. To our knowledge, this is one of the first studies to compare several PET tracers with co-registered MRI in the context of bone metastasis. Co-registration between these different modalities allows for a precise overlapping of both bone and metastasis metabolism on a high-resolution anatomic template and perfusion data provided by T1-weighted, contrast-enhanced MRI. We found that this experimental protocol allowed for a robust quantification of tumor progression and represents a valuable tool to monitor treatment.

Materials and methods

Cell culture

Mammary Rat Metastasis Tumor (MRMT-1) cells (carcinoma) were kindly provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University 4-1, Seiryō, Aoba-ku, Sendai, Japan) and cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Montreal, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (heat-inactivated) and 2% penicillin/streptomycin (Gibco, Montreal, QC, Canada), as described by Dore-Savard et al.(16). Cells were suspended at a final concentration of 30,000 cells in 20 μ l of HBSS and maintained on ice prior to their implantation in the rat femur.

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats (200-225 g; Charles River Laboratories, St.-Constant, QC, Canada) were maintained on a 12 h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. All animal-related procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke and were carried out according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Rats were acclimated to the animal facility for 4 days before surgery.

Surgery

After complete anesthesia with 5% isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada), surgical implantation of mammary carcinoma cells in the femur was performed as described by Dore-Savard et al.(16). Briefly, 20 μ l of the cell suspension (cancer group) were implanted in the medullar cavity of the rat femur. The injection site was sealed with dental amalgam (Prodigy A3, Kerr, Orange, CA). The site was thoroughly washed with sterile deionized water to avoid tumor development outside of the bone.

Histological procedures

Rats were deeply anesthetized with 5% isoflurane and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Bone specimens were

removed and placed in a histological cassette and post fixed overnight at 4°C in Neutral Formalin Buffer (10%). Then, the cassettes containing the tissues were placed into Super Decalcifier II Delicate solution (Polyscience Inc., Warrington, PA, USA) for 72 hours at room temperature. Decalcifying solutions were changed every 24 hours (twice) until complete decalcification was verified with the Poly-NoCal End Point Determination Kit (Polyscience Inc., Warrington, PA, USA). The bones were embedded in paraffin, bone sections (3 µm) were generated and classical hematoxylin-eosin staining was performed. Ki67 immunolabeling was performed on the same samples. After antigen retrieval, H₂O₂ treatment, and blocking of non-specific sites with TBS-BSA (2%), the sections were incubated overnight at 4°C with the anti-Ki67 antibody (1:100; Rabbit, Ki67 [SP6], monoclonal antibody, ab1667; Abcam, Cambridge, MA, USA). The samples were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). The signal was amplified using the Vectastain ABC Elite kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and developed using diamino-benzidine (ImmPACT DAB; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) as a chromogen. For negative controls the primary antibody was omitted during the immunohistochemical procedure. Bright-field pictures were taken with a Leica DM4000 microscope equipped with a Leica DFC350FX camera.

Radiological analysis

Micro-CT scans were performed using a high-resolution Micro-CT scanner (SkyScan-1072, Aartselaar, Belgium), and the subsequent 3D architecture analyses were completed using the associated software applications. The scanner was equipped with a sealed microfocus X-ray tube with a power source ranging from 20 to 100 kV (0 to 250 µA) and an X-ray CCD-camera based on a cooled 12-bit CCD-sensor of 1024 × 1024 pixels. The distal femurs were scanned at a source power of 80 kV/124 µA and a spatial sampling of 14.06 µm/pixel. The rotation was set at 0.9 degrees/step for 180 degrees, and the exposure time was set at 3.0 sec/step. Reconstruction of the dataset from the X-ray shadow images obtained from the scans was performed using NRecon (version 1.6.1.3), generating a

dataset of cross-sections that was then used to analyze the 3D architectural parameters and create 3D models with the CT-Analyzer (version 1.10.01).

Magnetic Resonance Imaging

MRI studies were conducted at the Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS) with a 210 mm diameter small-animal 7T scanner (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) and a 63 mm diameter volume RF coil. The rats were placed supine in an MRI-compatible cradle equipped with a custom-made paw support designed to position limbs both stably and reproducibly. The animals were anaesthetized with 3% (induction) and 1.5% (stabilization) isoflurane in oxygen. A feedback-controlled animal warm-air heater system (32°C) was used to maintain body temperature at physiological levels, and the respiration rate was continuously monitored (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA). The MRI protocol included the acquisition of axial (sagittal) pre-contrast and 10 min post-contrast T1-weighted images using a gradient echo sequence with a TR of 210 ms, TE of 3.35 ms, flip angle of 30°, matrix of 256 × 256, FOV of 60 × 60 mm², NA of 8 (30 sagittal slices), and thickness of 1.5 mm. A 500 µL bolus of the contrast agent (Gd-DPTA, Magnevist, Berlex) was injected in the tail vein. The animals were imaged at day 15 to ascertain the presence of the tumor and at day 18 to perform the analyses.

Positron Emission Tomography

Immediately after the MRI acquisition, the cradle with the animal was transferred to a PET scanner without interrupting the anesthesia or animal monitoring. PET imaging was performed using a LabPET4 (Gamma Medica, Northridge, CA, USA) APD detector-based small animal PET scanner with a 110 mm diameter by 37.5 mm axial length FOV. The scanner achieves a spatial resolution of 1.35 mm FWHM and an absolute sensitivity of 1.1% in the central FOV, with a 250-650 keV energy window(17). The animal was aligned to have the hind knee joints at the radial and axial center of the scanner FOV, and it received approximately 74 MBq of ¹¹C-MET followed by 18.5 MBq ¹⁸F-NaF, or 37 MBq of ¹⁸F-FDG alone by intravenous injection (200 µl at 500 µl/min). The accumulation of radiotracers in the target tissues was monitored by 30 min static imaging at 30 min post-administration for ¹⁸F-NaF and ¹⁸F-FDG, or 15 min static imaging post-administration for ¹¹C-MET.

Image visualization and analysis

PET and MRI image fusion was performed using a new Multi-Resolution Binarized Intensity Histogram (MRBIH) co-registration procedure that was specifically developed for small animal PET/MRI fusion (18). It combines low and high-resolution images to take advantage of the low noise sensitivity at coarse levels and higher contrast at higher levels. MRI was used as the fixed volume and PET was used as the floating volume. We used 3 multi-resolution levels for each MRBIH and aligned them for 9 parameters (translation, rotation and scaling in axial, sagittal and coronal planes) until they all converged at the same set of parameters.

PET and co-registered MR/PET images were visualized and analyzed with OsiriX viewer (v4.0-64 bit). To determine the level of variation in radiotracer uptake, the mean and maximal Standardized Uptake Values (SUV_{mean} and SUV_{max}) were calculated according to the following formulas(13): $SUV_{\text{mean}} = \text{Mean Uptake Value} / (\text{Dose injected (MBq)} * \text{Animal weight (kg)})$ and $SUV_{\text{max}} = \text{Maximal Uptake Value} / (\text{Dose injected (MBq)} * \text{Animal weight (kg)})$

SUV was valued within the boundaries of a Region-Of-Interest (ROI), which was delimited on the MR images of the cancer-implanted paw. For ^{18}F -FDG (N = 6) and ^{11}C -MET (N = 4) images analyses, two ROIs were used for each slice, one for delimiting the bone content and one consisting of the extra-osseous region (See figures 2B and 3B). The ROIs were then pasted on the corresponding co-registered PET images. Raw data (mean, max and area) were extracted from these ROIs, and the SUV_{mean} and SUV_{max} were calculated. ROIs were drawn on three slices per paw. Each ipsilateral slice was matched with its contralateral counterpart for statistical comparisons. For NaF images, inclusive ROIs were drawn to define the diaphysis (shaft) and the distal metaphysis/epiphysis (extremity) of the femur. SUV_{max} values were then calculated using the same method. The most representative slice, in which the whole femur could be observed, was used for each paw (N = 6). A 5 mm² circular ROI was drawn at a consistent distance from the bone in the *biceps femoris* to determine the level of background signal in the tissue, and this value was subtracted from the mean and maximal values for each tracer.

Statistical analysis

A paired, non-parametric t-test (Wilcoxon's) was used to compare ipsilateral to contralateral paws in terms of SUV_{mean} and SUV_{max} , and $p < 0.05$ was considered to be significantly different.

Results

Proliferation of MRMT-1 cells implanted in the femoral medullary cavity was monitored using repeated MRI acquisition, *ex vivo* μ CT analyses and histological staining procedures (Figure 1). On day 9 post-implantation, sagittal contrast enhanced T_1 -weighted images showed that the tumor cells already had an effect on the bone microenvironment (white arrow). Indeed, contrast enhancement was observed throughout the distal femur. On day 15, MRI showed that the bone morphology was modified at the distal extremity of the femur (white arrow). The bone cortical line was less defined, and contrast enhancement appeared at the boundary of the bone (blue arrow). As observed in our previous study(16), tumor growth induced inflammation and oedema in the surrounding environment, particularly in the interstitial space, by creating a distension of the periosteal compartment and overlaying muscular tissues. On day 18, the extent of tumor spread was observed in extra-osseous tissues. Bone degradation progressed rapidly, making it difficult to detect the structure in the most affected regions of the bone cortex (red arrows). Bone resorption was confirmed using μ CT analyses and histological observations. From day 9 through 15, trabecular degradation progressed rapidly and bone cortex invasion began. On day 9, only minor alterations were visible on the surface of the bone. On histological slices, tumor cells were detected in the metaphysis and the endosteal surface of the bone (black arrow). Healthy bone marrow was observed near the tumor (black arrowhead). At that stage, Ki67 immunostaining showed relatively sparse positive tumor cells (red arrowheads). By day 15, the bone cortex was highly modified and the trabeculae architecture was compromised. However, bone density was still appreciable due to an abundance of osteoblasts compensating for the lytic activity of the tumor (orange arrows). Ki67 immunostaining was drastically increased 15 days after tumor cell implantation. On day 18, bone content was markedly reduced, increasing the risk of traumatic fracture at

that stage. The abundance of tumor cells was confirmed by histological analysis, which revealed that the tumor had completely replaced the bone marrow, and only sparse bone insertions were observed in the medullary cavity. Multi-nucleated active osteoclasts were abundant at the tumor-bone interface (purple arrows), and cell leakage occurred through bone cortex. Ki67-positive cells were observed sparsely throughout the tissue, but necrosis was present in important parts of the bone at that stage.

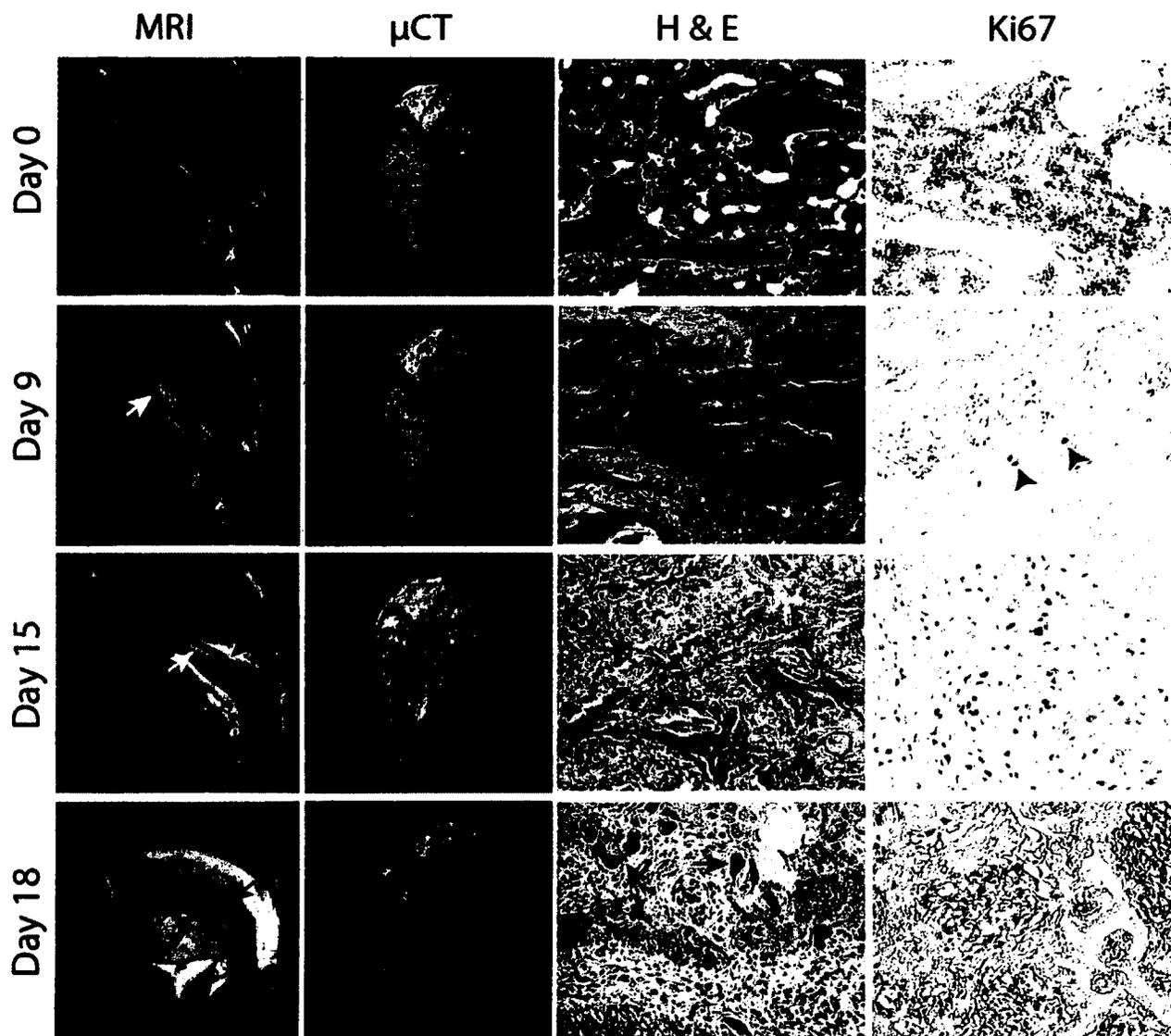


Figure 1. Characteristics of a mammary-derived bone metastasis model. The bone tumor (implantation site shown by yellow arrow) was monitored on days 9, 15 and 18 post-implantation using MRI and μ CT. We first observed contrast enhancement in the ipsilateral medullary channel on days 9 and 15 (white arrows). The cortical line of the bone was already partially resorbed on day 15, and the tumor had started to spread outside of the bone (blue arrow). On day 18, the extra-osseous tumor had grown extensively. The cortical bone line was interrupted on the surface of the femur (red arrows). On histological slices, hematoxylin-eosin staining showed partial invasion of the medullary channel and the endosteal surface at the metaphysis level

at day 9 (black arrow). However, healthy bone marrow and trabecular bone persisted in tumor surroundings (black arrowhead). Ki67 immunostaining showed relatively sparse positive tumor cells on day 9 (red arrowheads). On day 15, the tumor invaded the metaphysis completely and Ki67-positive cells were abundant. Numerous active osteoblasts were observed on the trabecular bone surface (orange arrows). On day 18, the tumor cells were less active, according to Ki67 staining, while osteoclastic activity was maximal with several gigantic multinucleated cells (purple arrows).

The radiotracer ^{18}F -FDG was used to determine the relative glucose metabolism of the bone environment in the presence of MRMT-1 tumor progression (Figure 2). MRI was first performed to determine the exact anatomical contour of the bone and surrounding tissues as well as to ascertain the presence of the tumor (Figure 2A). PET scanning of ^{18}F -FDG was then sequentially co-registered, showing only epiphyseal background activity that could be mainly attributed to the bone marrow blood flow in the contralateral paw(19,20). MRI-PET registration allowed us to perform region-specific analyses of the bone environment. On day 15, our previous results demonstrated the consistent presence of a tumor, ranging in size from 25 mm³ and 60 mm³(21). At that stage, PET images showed elevated accumulation at the border of the metaphysis/diaphysis region compared to the contralateral side. ^{18}F -FDG uptake foci corresponded to areas where the bone cortex was damaged and heavy trabecular bone resorption occurred, as observed on co-registered MR images (white arrows). On day 18, the cortical bone showed severe breaches through which the tumor had leaked, creating a distension of the periosteal compartment. The hyperintense MR signal in this extraosseous compartment converged with strikingly elevated ^{18}F -FDG uptake. Indeed, selected regions-of-interest (ROI) analyses (Figure 2B) highlighted the increased SUV_{mean} in both the bone (0.707 ± 0.076 vs 0.439 ± 0.057) and extra-osseous tissue (0.720 ± 0.081 vs 0.134 ± 0.079) compared to the corresponding contralateral paw ($p = 0.0002$, $N = 6$). The SUV_{max} was also systematically increased in the bone tissue of the cancer paw when compared to the healthy paw (2.40 ± 0.40 vs 2.13 ± 0.45 ; $p = 0.02$) or surrounding soft tissues (2.35 ± 0.39 vs 0.59 ± 0.16 ; $p = 0.0002$, $N = 6$). In contrast, a cold ^{18}F -FDG spot was observed in the medullary channel of the femur (black arrows). This low glucose accumulation corresponded to necrotic clusters, as shown on the corresponding histological sections.

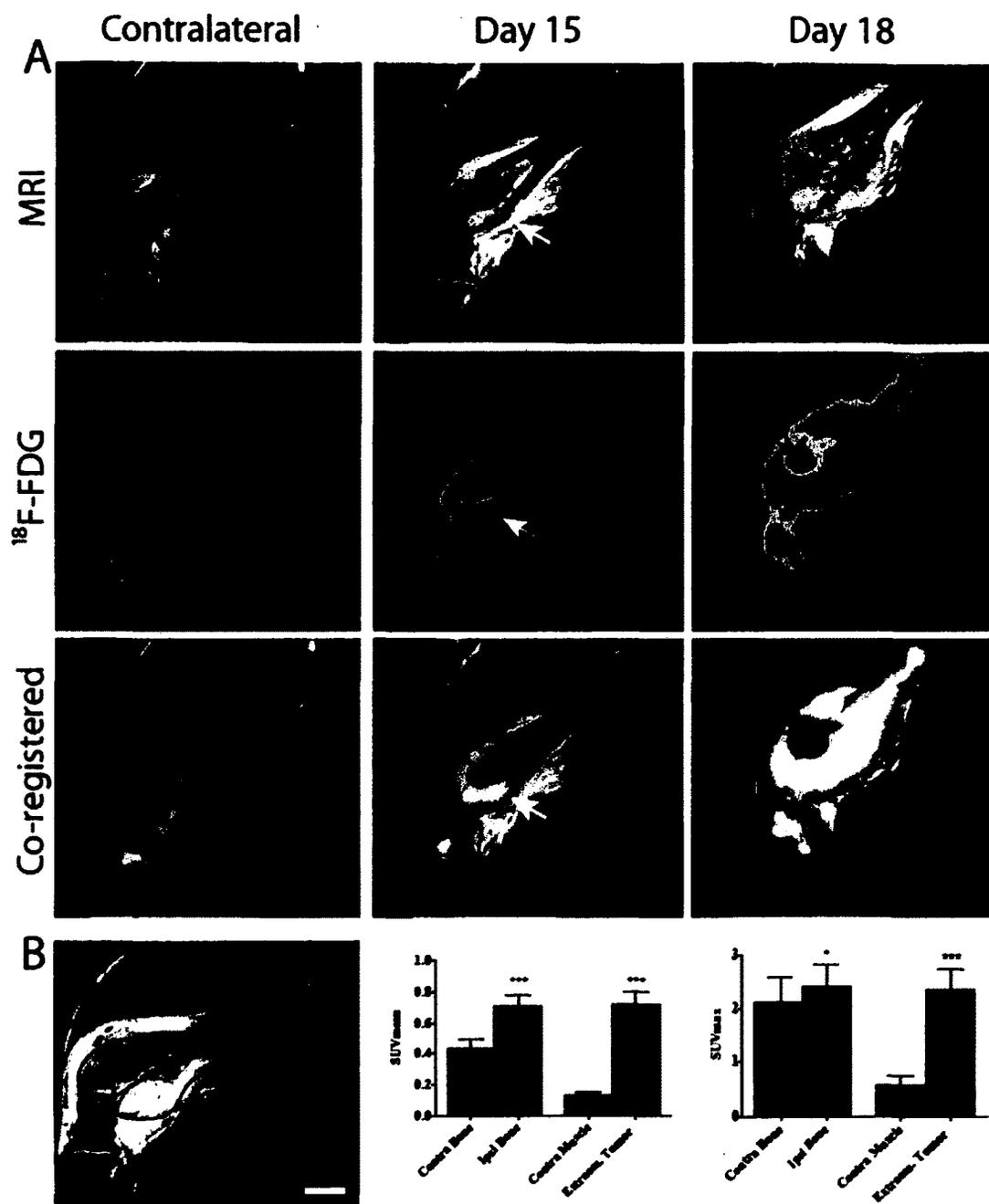


Figure 2. Contrast-enhanced MRI/ $^{18}\text{F-FDG}$ PET imaging of a bone tumor. A) On $^{18}\text{F-FDG}$ PET scans, the contralateral bone showed low uptake levels in the metaphysis/epiphysis region, which was composed of healthy trabecular bone. $^{18}\text{F-FDG}$ uptake increased on day 15 and was maximal on day 18. Co-registered images showed a strong co-localization of contrast-enhancement on MRI and high $^{18}\text{F-FDG}$ uptake on PET (white arrows). A low uptake area corresponding to necrotic clusters was present in the medullary channel of the femur on day 18 (black arrows). B) Graphic of ROI selection in the bone (red) and in the extra-osseous tumor (green) at day 18. ROI analyses in terms of SUV_{mean} and SUV_{max}.

Methionine is a key amino acid in protein metabolism because it is the first amino acid incorporated into protein during translation. Hence, methionine incorporation is a relevant indicator of increased protein synthesis in tumor cells. After ^{11}C -MET administration (Figure 3A), we observed a high level of tracer accumulation in healthy bone marrow compared to the surrounding soft tissue. However, the accumulation site of the tracer was modified at an advanced stage of the disease. Indeed, the relative amount of tracer was increased on day 15 in the distal diaphysis. The observation of co-registered MR/PET images correlated with a disto-proximal migration of the tumor in the medullary cavity. Indeed, ^{11}C -MET accumulation highly co-localized with MRI contrast enhancement (red arrows). On day 18, the tracer accumulated in a ring-shaped region, while the core of that volume seemed to be metabolically inactive. After ROI analyses of the bone and extra-osseous tissue (Figure 3B), we found that the SUV_{mean} was significantly decreased in the ipsilateral bone (1.26 ± 0.10 vs 2.04 ± 0.25 , $p = 0.01$), while the SUV_{max} remained unchanged (3.06 ± 0.44 vs 3.49 ± 1.09 ; $p = 0.28$). Areas in the periphery of the bone that were highly positive for ^{11}C -MET were also hyperintense on contrast-enhanced MR images (blue arrows). Accordingly, we observed a significant increase in both the SUV_{mean} (2.08 ± 0.16 vs 0.20 ± 0.06 ; $p = 0.001$) and the SUV_{max} (3.28 ± 0.16 vs 1.35 ± 0.30 ; $p = 0.007$, $N = 6$) in this extra-osseous compartment. Conversely, areas inside the medullary channel that were observed to be hyperintense by MRI did not appear to accumulate the ^{11}C -MET tracer and could correspond to necrotic areas.

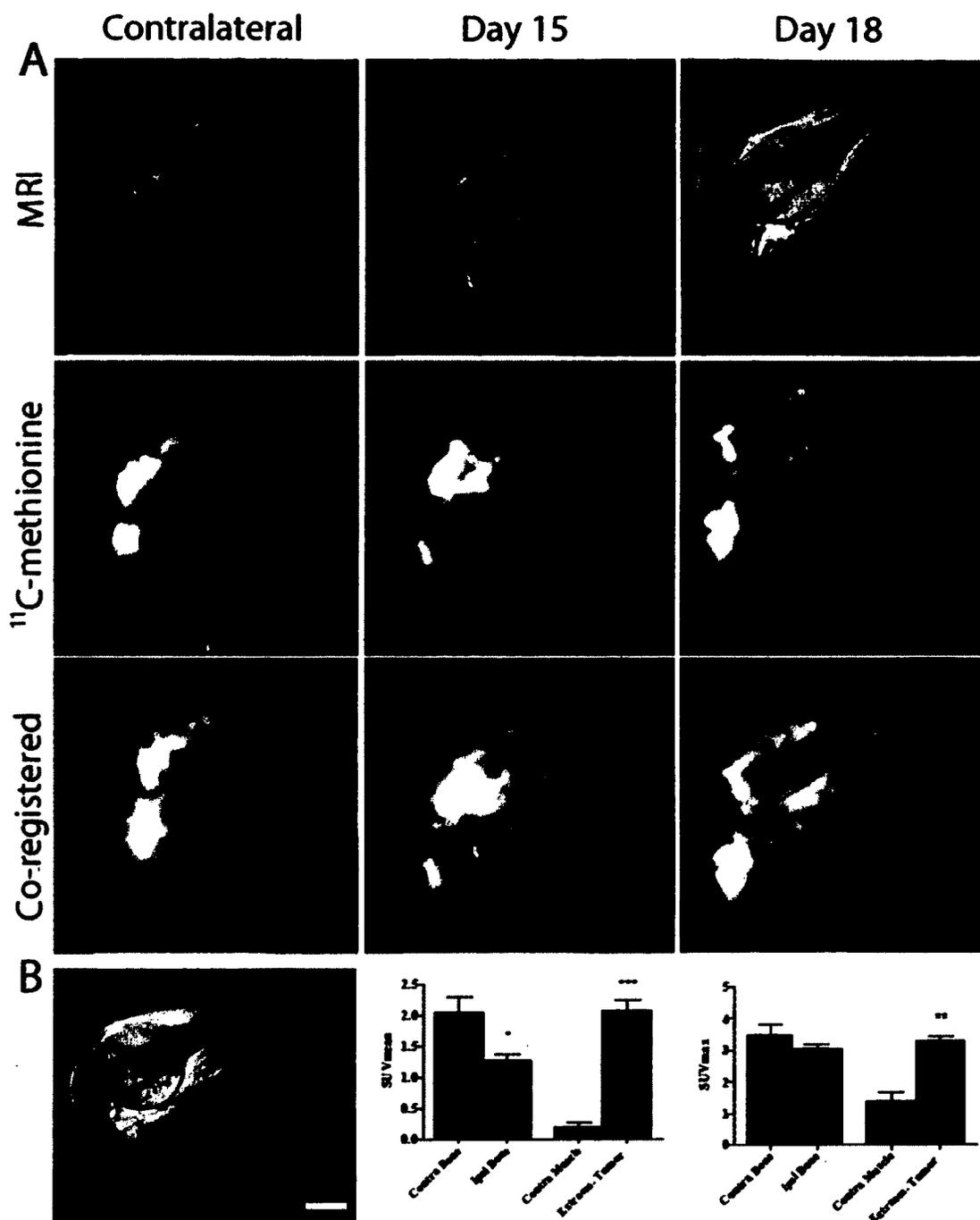


Figure 3. Contrast-enhanced MRI/¹¹C-methionine PET imaging of a bone tumor. On ¹¹C-MET PET images, the contralateral bone shows high uptake level in both the extremity and the shaft. Background level is also relatively high in the muscle. On day 15, ¹¹C-MET uptake is confined to the metaphysis and epiphysis and to the tumor growth that is emerging on the posterior surface of the bone (red arrow). On day 18, the radiotracer uptake is localized mainly in the extra-osseous tumor. That is confirmed by co-registered images where extra-osseous contrast enhancement on MR images co-localized with ¹¹C-MET uptake on PET images (blue arrows). B) Graphic of ROI selection in the bone (red) and in the extra-osseous tumor (green). ROI analyses in terms of SUV_{mean} and SUV_{max}. Scale bar: 5 mm.

The high affinity of fluoride ions for the bone matrix makes it the tracer of choice for bone surveillance. Healthy bones showed a high tracer uptake in the femoral epiphyses (cyan oval shapes), a sign of homeostatic trabecular bone turnover (Figure 4A). On the other hand, the bone shaft captures negligible amounts of tracer, corresponding to a lower level of bone remodeling(22). In cancer bearing animals, the bone metabolic activity significantly changed in the vicinity of the tumor. On day 15, ^{18}F -NaF uptake was increased in the distal medullary channel (white arrows). This trend was confirmed on day 18, when the mean and maximal uptake (SUV_{max} , SUV_{mean}) of ^{18}F -NaF were significantly increased in the diaphysis (26.9 ± 3.8 vs 11.0 ± 0.8 ; $p = 0.03$ and 7.52 ± 1.6 vs 5.48 ± 0.21 ; $p = 0.03$, respectively) (yellow arrows). This result is likely a sign of osteoblastic activity counterbalancing the lytic activity of the tumor. Indeed, MR/PET co-registered images allowed us to pinpoint a majority of the ^{18}F -NaF uptake at the boundaries of the tumor, where osteoclasts and osteoblasts are abundant, as shown on histological slices. However, the SUV_{max} and SUV_{mean} of ^{18}F -NaF were decreased at the distal extremity (25.8 ± 3.1 vs 38.2 ± 1.9 ; $p = 0.03$ and 11.7 ± 1.7 vs 18.5 ± 0.9 ; $p = 0.0625$, respectively. $N = 6$). For instance, tracer accumulation was close to zero in areas that were hyperintense on day 15, indicative of important resorptive activity during that 3-day period, which resulted in the loss of bone content (blue arrows).

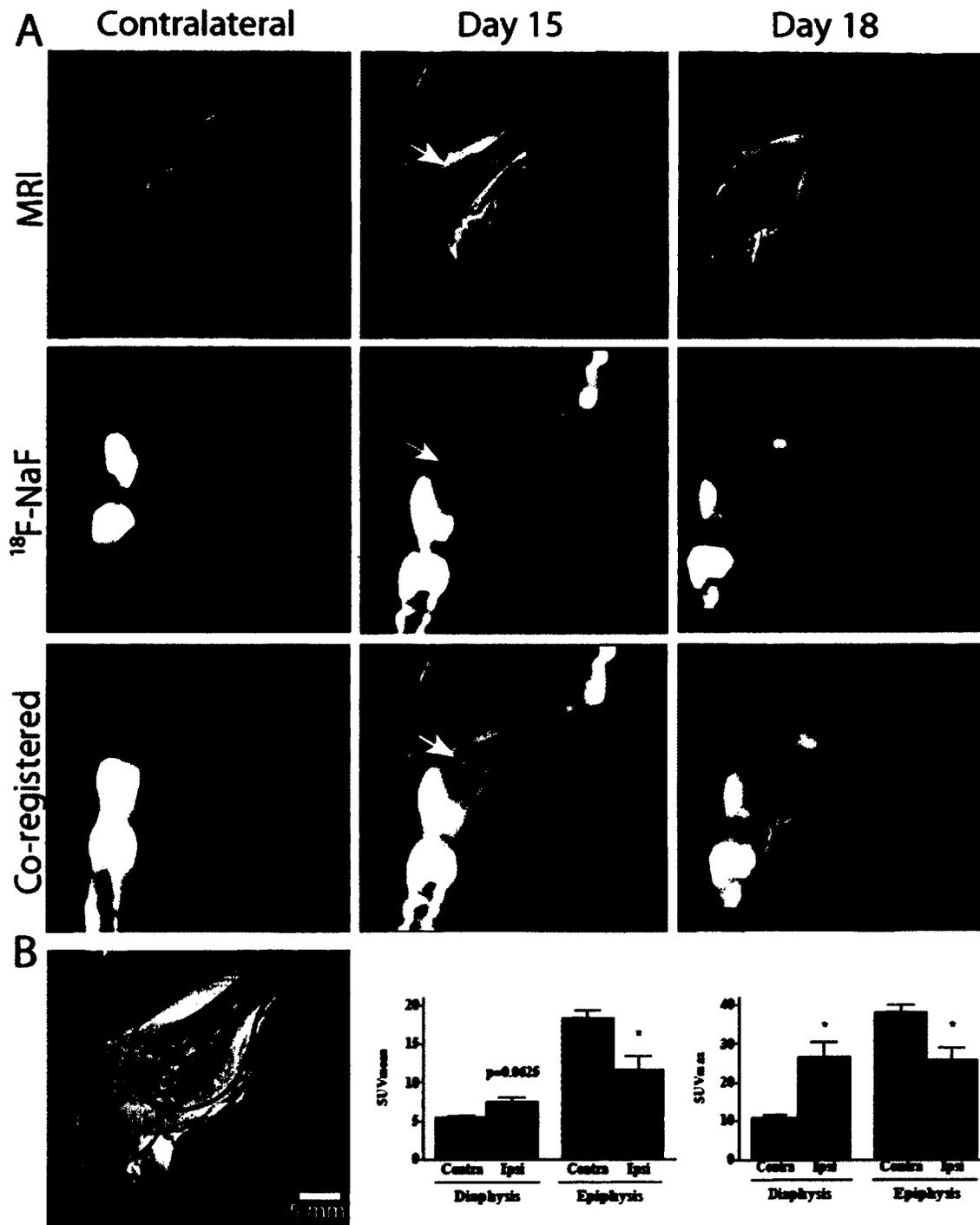


Figure 4. Contrast-enhanced MRI/ $^{18}\text{F-NaF}$ PET imaging of a bone tumor. The contralateral healthy bone showed high uptake levels in the metaphysis (cyan oval shapes), while the diaphysis showed little tracer accumulation. On day 15, uptake was increased in the distal femur, especially where bone structure modifications were visible on MR images (white arrows). On day 18, high uptake was observed on the proximal edge of the tumor (yellow arrows), and low uptake areas were present where bone degradation was more extensive and the tumor had emerged from the bone (blue arrows). B) Graphic of ROI selection in the diaphysis (red) and in the metaphysis/epiphysis (green) at day 18. ROI analyses in terms of SUV_{max} and SUV_{mean} in the diaphysis and metaphysis/epiphysis.

Merged ^{11}C -MET and ^{18}F -NaF PET images are displayed in Figure 5. On day 15, ^{11}C -MET positive regions were strongly co-localized with ^{18}F -fluoride, as ^{18}F -NaF uptake on the anterior surface of the bone corresponded exactly with focal regions of high ^{11}C -MET uptake (blue arrows). The co-localization of both bone and tumor activity results in the degradation of the bone matrix and cancer cells leakage out of the medullary channel. The latter was confirmed on day 18, when ^{11}C -MET uptake at the distal level extended far beyond the bone structure. At that level, the ^{18}F -NaF signal was virtually absent within the tumor. The co-localization of both tracers was only observed in peripheral portions of the tumor at the most proximal level and at the epiphysis of the femur (white arrows). Alternatively, we observed numerous regions where only one tracer was present. For example, ^{18}F -NaF accumulation was detected in the bone cortex on both MRI and ^{11}C -MET PET but not in the tumor mass (yellow arrows). On the other hand, the tumor was very active in areas where ^{18}F -NaF accumulation was absent.

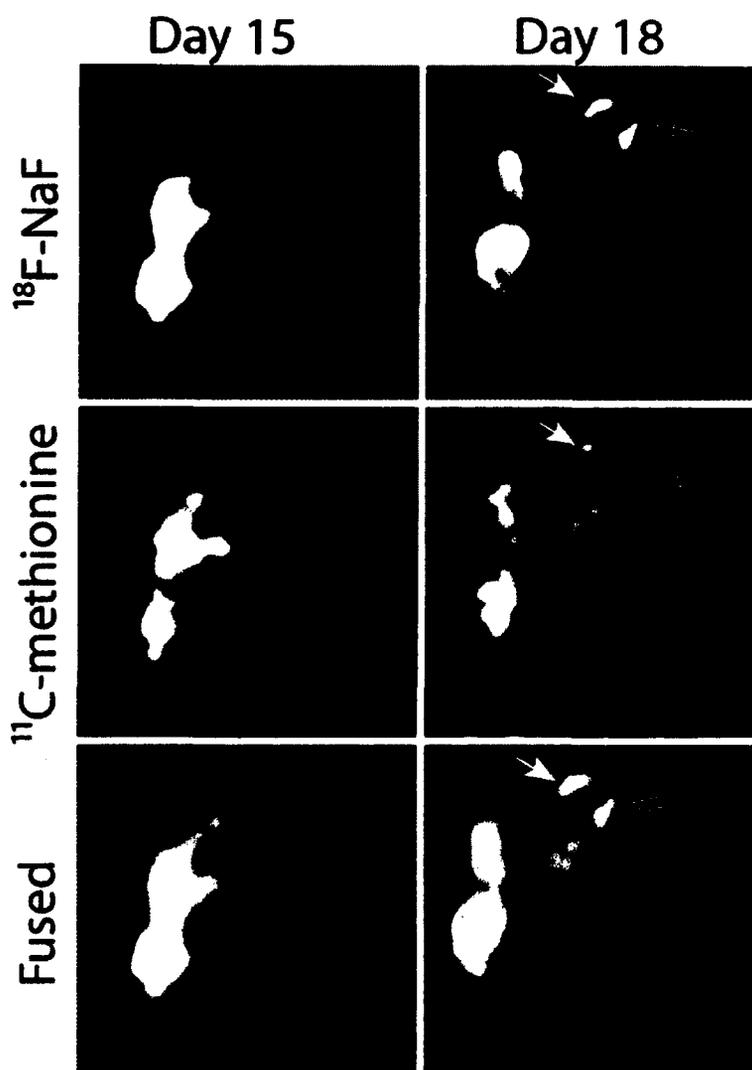


Figure 5. Fusion of ^{11}C -methionine and ^{18}F -fluoride PET images. Fused PET images show a strong colocalization of ^{18}F -fluoride and ^{11}C -MET uptake on day 15 on the anterior surface of the femur (blue arrow). On day 18, most of the ^{11}C -MET uptake is exempt of fluoride labeling except for small fluoride-positive foci on the proximal edge of ^{11}C -MET-uptaking tumor (white arrow). It seems that the most proximal part of ^{18}F -fluoride-uptaking regions is not co-localized with ^{11}C -MET uptake (yellow arrow).

Finally, we compared every tracer and each relevant parameter to determine how it would facilitate future analyses (Table 1). We first compared the variations of SUV_{mean} and SUV_{max} , independently of the tracer used. The differences in the fold change of the standardized uptake values of ^{18}F -FDG or ^{11}C -MET (compared to the contralateral side) was systematically greater when calculated for the SUV_{mean} [0.6; 10.4] than for the SUV_{max} [1.1; 4.0]. Furthermore, the percentage of variability between inter-individual uptake values was also consistently smaller for the SUV_{mean} [7.6; 11.3] than for the SUV_{max} [4.9;

31.2]. The ^{11}C -MET extra-osseous uptake value was the sole exception, where the SUV_{max} variability (4.9%) was lower than that of the SUV_{mean} (7.6%). We then compared the ^{18}F -FDG and ^{11}C -MET tracers to determine if they were comparable in terms of the variations of the uptake parameters. Both ^{18}F -FDG and ^{11}C -MET revealed important fold changes in the bone and extra-osseous tissues after computing the SUV_{mean} for a reference. Both were poorly relevant in the bone when relying solely on the SUV_{max} (1.1 fold increase). Alternatively, the fold increase was higher using the SUV_{max} (2.4 vs 1.6 for SUV_{mean}) in the diaphysis of ^{18}F -NaF scans. However, as was observed with the other tracers, inter-individual variability was lower when the SUV_{mean} was used. The use of the SUV_{max} or SUV_{mean} appeared to be equivalent in the epi/metaphysis.

Table 1. PET tracer uptake parameters in the bone following the implantation of a mammary-derived tumor.

| Radionuclide | Region | SUV_{mean} | | SUV_{max} | |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | | Fold Increase | % Variability | Fold Increase | % Variability |
| ^{18}F -FDG | Bone | 1.6*** | 10.7 | 1.1* | 16.7 |
| | Extra-osseous | 5.1*** | 11.3 | 4.0*** | 16.6 |
| ^{11}C -Methionine | Bone | 0.6* | 7.9 | 1.1 | 31.2 |
| | Extra-osseous | 10.4*** | 7.8 | 2.4** | 4.9 |
| ^{18}F -NaF | Diaphysis | 1.6 | 8.9 | 2.4* | 14.1 |
| | Epi/metaphysis | 0.6* | 14.6 | 0.7* | 12.0 |

*, **, ***: $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively vs contralateral paw

Discussion

Bone scintigraphy (coupled with or without SPECT) and computed tomography remain the gold standards for the detection of bone metastases in oncology. However, MRI and PET are becoming more accessible in the clinic, and their potential for bone metastases detection is being exploited. Moreover, it has been demonstrated that bone cancer patients would benefit from a non-invasive approach for multiple screenings in replacement of painful biopsies and repeated high-radiation procedures. MR/PET co-registration provides detailed anatomical data coupled with metabolic information, such as glucose consumption, protein synthesis and bone turnover. It also raises important questions regarding the specificity of radiotracer accumulation in tumor tissues. The purpose of this study was to evaluate a MR/PET co-registration procedure using ^{18}F -FDG, ^{11}C -MET and ^{18}F -NaF as tracers in an animal model of mammary carcinoma-derived bone metastasis. The fusion of ^{18}F -NaF and ^{11}C -MET images allows for the interpretation of the relationship between tumor metabolism and bone metabolism in cancerous femurs.

In the present study, we were able to register MR and PET images obtained sequentially for the visualization of tumor-induced modifications at the bone level. The use of MRI as a co-modality for PET was of particular interest for the determination of our regions of interest. Indeed, we were able to limit our analysis to the exact contour of either the tumor or the bone, as determined by contrast enhancement, which allowed for the analysis of carefully selected sub-regions and the exclusion of normal tissue. Therefore, we were able to highlight differences in tracer accumulation between these sub-regions. This technique could prove useful to ameliorate the precision of diagnosis criteria for bone tumors, which is often limited to a global scan for the SUV_{max} evaluation.

The information provided by MR/PET images corroborates what we observed in histological sections. Indeed, ^{11}C -MET and ^{18}F -FDG uptake has been associated with proliferative tumors *in vitro*(23). *In vivo*, the level of proliferation, as assessed by Ki67 staining, was associated with histological characteristics in a rat glioblastoma model(24). In human patients, histological profiles of suspected glioblastomas were in accordance with

^{11}C -MET uptake levels (25), and ^{11}C -MET uptake was strongly correlated with proliferation(26,27). This finding could reflect an increase in L-type amino acid transporter expression(28). However, one has to consider that the permeable vasculature of a tumor allows for passive diffusion and retention of the tracer in the tumor environment. In our study, increased staining was observed in tumor foci on the histological sections of femurs labeled with Ki67. In parallel, ^{11}C -MET and ^{18}F -FDG accumulation was strongly increased in late stage disease, reinforcing the hypothesis that increased uptake of these tracers may be a good predictor of the histological profile. The lack of ^{18}F -NaF accumulation in the most active parts of the tumor, which were also positive for Gd-DTPA and ^{11}C -MET, suggests specific accumulation of ^{18}F -NaF in the bone and specific accumulation of ^{11}C -MET in the tumor. However, discrepancies between the accumulation of Gd-DTPA and the accumulation of ^{11}C -MET or ^{18}F -FDG suggest the specific uptake of these PET tracers in active tumor cells instead of inactive necrotic clusters. In late stage disease, Gd-DTPA is localized in the central portion of the tumor, which is considered to be necrotic on histological slices, and both ^{11}C -MET and ^{18}F -FDG accumulations are absent. We cannot exclude the possibility that Gd-DTPA diffusion during the timeframe of the imaging study may be responsible for these differences, and further dynamic studies are necessary to answer these important questions.

Despite the fact that they are depicting different cellular processes, ^{11}C -MET and ^{18}F -FDG both provided information allowing for the detection of mammary-derived bone metastases in our model. However, the fold change in the uptake was greater with ^{11}C -MET than ^{18}F -FDG when considering the SUV_{mean} . This difference between these tracers could be important, and it favors the extended use of ^{11}C -MET in the future. Early experiments in humans showed similar bone uptake in prostate cancer patients(29). Their study compared ^{11}C -MET and ^{18}F -FDG uptake and concluded that ^{11}C -MET detected significantly more metastases in both the bone and soft tissue of patients. We suggest that this enhanced signal could be important for the preclinical and clinical detection of bone metastases and could be a product of improved sensitivity. ^{11}C -MET PET was also evaluated in multiple myeloma, and its uptake was increase by six-fold in marrow lesions(30). Increased uptake

in cancerous bone marrow was not observed in our study. Actually, the SUV_{mean} was decreased in our model. Those disparities may be caused by the advanced stage of our model at the time of analysis or differences between tumor cell types. We observed that the accumulation of ^{18}F -FDG was localized in areas corresponding to non-tumorous tissues, adjacent to the mass. This finding is not surprising because it has been shown that ^{18}F -FDG uptake was enhanced in inflamed tissue invaded by macrophages and other inflammatory cells, accounting for approximately 25% of the uptake of this tracer in certain tumors(31). ^{11}C -MET uptake is low in inflamed tissue(32). Thus, we believe that ^{11}C -MET allows for a more precise determination of the tumor boundaries, in accordance with MR images. This hypothesis is supported by the fact that ^{11}C -MET has been identified as a better candidate tracer for guiding biopsies in brain cancer and as a better tool for the evaluation of head and neck cancer treatment(33). We also detected a certain number of limitations of this tracer. First, it became evident that the signal/noise ratio was poor for ^{11}C -MET. Unexpectedly, we also found relatively high uptake of ^{11}C -MET in healthy bones. The latter finding was also observed in clinical studies(34). This finding is an important factor that explains the relatively low magnitude of variation between the SUV_{max} of healthy and cancerous bones. Different versions of the SUV_{max} , such as the SUV_{4max} have been used recently. Statistical variability could be reduced with this parameter(35).

The fact that MET is labeled with the short-lived carbon-11 isotope allows for the sequential use of a second tracer, such as a $Na^{18}F$, in the same PET imaging session. To date, it is not possible to sequentially scan a patient with ^{18}F -FDG, then with ^{18}F -NaF, in a realistic time frame in the clinic. In a preclinical model of bone cancer such as ours, scanning the animal on two different days is not acceptable because the time lapse would be sufficient to observe important variability in the stage of the disease, which would be problematic for the fusion of images. In our study, the short half-life of ^{11}C -MET (20 min) circumvented this problem. The simultaneous visualization of tumor metabolism and bone turnover using ^{18}F -NaF in the same scanning procedure could improve bone tumor monitoring and help in designing future therapies. Indeed, the management of breast cancer patients presenting bone metastases is most often based on multimodal treatments that affect bone turnover (bisphosphonates) and/or the tumor itself (chemo-

radiotherapy)(36). Discriminating between antineoplastic therapeutic success and the bone homeostasis re-establishment is important to ascertain the quality of the clinical strategy. In a preclinical setting, the degree of precision provided by a non-invasive, multi-tracer PET approach could improve our ability to screen for new anti-cancer, anti-resorptive and analgesic treatments and their possible side-effects. The sole drawback of this approach is the necessity of an on-site cyclotron, which is required for tracer synthesis, given the short half-life of ^{11}C (33).

The SUV_{max} has been widely used in clinical studies to assess the metabolic activity in a malignant tumor(37). The main advantage of this parameter is its independence from the method used to draw the ROI. Indeed, an imprecise ROI will yield the same SUV_{max} value as long as the most active part of the tumor is included in that ROI. It has been reported that the variability of the SUV_{max} parameter between successive scans in the same patient was higher than that for the SUV_{mean} (38), making the latter a better option. However, the experimental pattern in that study allowed for changes in tumor metabolism between scans, which could contribute to more variability in both parameters. Further, ^{18}F -FDG and ^{11}C -MET tracers analyses were compared based on their SUV_{mean} , SUV_{max} or SUV_{min} parameters in a human study(29). However, it was difficult to highlight the advantage of using one of these parameters over the others. This difficulty is not surprising, considering the high statistical variability inherent in single pixel values, such as SUV_{max} and SUV_{min} , and the systematic uncertainty that may result from the ROI-dependent SUV_{mean} estimates. In our study, because ROIs were safely delimited based on co-registered contrast-enhanced MR images, we observed significantly less inter-individual variability for the SUV_{mean} (9.6%) compared to the SUV_{max} (22.5%). The clinical significance of such variability needs to be carefully assessed, but it is likely that preclinical studies would benefit from a firmer parameter for evaluating the outcome of a treatment through screening, particularly given the limited number of animals allowed in these experiments. The SUV calculation assumes that the tracer was 100% specifically taken up by cancer cells. However, this cannot be the case as an unknown portion of the tracer accumulation is non-specific. Moreover, the tumor contour revealed by contrast-enhanced MRI and the extent of radiotracer uptake can be prone to systematic disparities that will affect the SUV_{mean} calculation. Thorough

comparison of Gd-DTPA and PET, tracer accumulation patterns could provide additional information in future experiments.

In addition, the method used for drawing the ROI is a significant factor for SUV calculation(39). It has been reported that manually drawn ROIs are more precise than threshold-determined regions. In fact, the ROIs were drawn on PET images without a co-modality, and the SUV variability between two scans was 8% in the manual method and up to 13% using threshold methods(39). The ROI volume was also more variable using threshold methods (variability up to 55%) compared to the manual method (20%) in that study. We explored the possibility of using MRI to manually draw our ROIs as a support system for determining high-resolution anatomical markers. We believe that this approach allowed us to objectively determine the bone and tumor boundaries. The inclusion of the whole bone structure in the ROI, or its exclusion from soft tissue uptake quantification, was performed with greater confidence. User-dependent variability cannot be excluded using this method, but MR images did help minimize inter-user variability by standardizing the visual criteria and relying only on the anatomical aspect of the area as a criterion for drawing ROIs. The inter-rater reliability using this method has been demonstrated in Alzheimer disease(40), with coefficients of variation ranging between 3% and 10% for both the manual and automated methods. Automated ROI drawing is unlikely to produce a similar degree of accuracy with the bone at this point, but could be an avenue for future development. This method would require systematic evaluation, but it should be easily transferable to any location where MR/PET co-registration is available in preclinical and clinical settings.

In conclusion, this study adds to the relevance of non-invasive, multi-modality multi-tracer imaging for the detection and visualization of bone metastases, especially in preclinical models. A longitudinal study is necessary to evaluate the capacities of each PET radiotracer to detect the bone tumor at an early stage in our model. Nonetheless, we showed that ^{18}F -FDG, ^{11}C -MET and ^{18}F -NaF are valuable tools to evaluate the extent of tumor invasion and the impact on bone architecture. We also showed that MR/PET co-registration significantly improved ROI drawing, based on anatomical information. We look

forward to applying our multimodal imaging approach to drug treatment monitoring in our bone cancer model.

Acknowledgements

This work is supported by the CIHR grant # MOP-219596, the Cancer Research Society and the Quebec Bio-imaging Network. ML is the Canada Research Chair in Magnetic Resonance Imaging. PS is a FRQS research scholar junior 2. LDS and NB are both recipients of the Frederick-Banting-and-Charles-Best CIHR doctoral scholarship. RL, ML, PS are members of the FRQS-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel. We thank Mélanie Archambeault, Véronique Dumulon-Perreault, Sébastien Tremblay and Maxime Paillé for technical assistance. We also thank Renée Bernatchez and Yongjun Xiao from the Center for Bone and Periodontal Research for their assistance with μ -CT and histological analyses. Finally, we thank Felix Morency and other staff from the Plateforme d'analyse et de visualization d'image (<http://pavi.dinf.usherbrooke.ca/>) for their assistance with image processing and analysis.

References

1. Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer*. 1997Oct.15;80(8 Suppl):1588-94.
2. Cicek M, Oursler MJ. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer Metastasis Rev*. 2006Dec.;25(4):635-44.
3. Costelloe CM, Rohren EM, Madewell JE, Hamaoka T, Theriault RL, Yu T-K, et al. Imaging bone metastases in breast cancer: techniques and recommendations for diagnosis. *Lancet Oncol*. 2009Jun.;10(6):606-14.
4. Robertson IJ, Hand F, Kell MR. FDG-PET/CT in the staging of local/regional metastases in breast cancer. *Breast*. 2011Dec.;20(6):491-4.
5. Histed SN, Lindenberg ML, Mena E, Türkbey B, Choyke PL, Kurdziel KA. Review of functional/anatomical imaging in oncology. *Nucl Med Commun*. 2012Apr.;33(4):349-61.
6. Tubiana-Hulin M. Incidence, prevalence and distribution of bone metastases. *Bone*. 1991;12 Suppl 1:S9-10.
7. Houssami N, Costelloe CM. Imaging bone metastases in breast cancer: evidence on comparative test accuracy. *Ann Oncol*. 2012Apr.;23(4):834-43.
8. Yang H-L, Liu T, Wang X-M, Xu Y, Deng S-M. Diagnosis of bone metastases: a meta-analysis comparing ¹⁸F-FDG PET, CT, MRI and bone scintigraphy. *European radiology*. 2011Dec.;21(12):2604-17.
9. Tryciecky EW, Gottschalk A, Ludema K. Oncologic imaging: interactions of nuclear medicine with CT and MRI using the bone scan as a model. *Seminars in nuclear medicine*. 1997Apr.;27(2):142-51.
10. Hamaoka T, Madewell JE, Podoloff DA, Hortobagyi GN, Ueno NT. Bone imaging in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004Jul.15;22(14):2942-53.
11. Winkelmann CT, Figueroa SD, Rold TL, Volkert WA, Hoffman TJ. Microimaging characterization of a B16-F10 melanoma metastasis mouse model. *Mol Imaging*. 2006Mar.;5(2):105-14.
12. Hsu WK, Virk MS, Feeley BT, Stout DB, Chatziioannou AF, Lieberman JR. Characterization of osteolytic, osteoblastic, and mixed lesions in a prostate cancer mouse model using ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med*. 2008Mar.;49(3):414-21.
13. Czernin J, Satyamurthy N, Schiepers C. Molecular mechanisms of bone ¹⁸F-NaF

- deposition. *J Nucl Med*. 2010Dec.;51(12):1826–9.
14. Bäuerle T, Komljenovic D, Semmler W. Monitoring molecular, functional and morphologic aspects of bone metastases using non-invasive imaging. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012Mar.;13(4):584–94.
 15. Wehrl HF, Judenhofer MS, Wiehr S, Pichler BJ. Pre-clinical PET/MR: technological advances and new perspectives in biomedical research. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009Mar.;36 Suppl 1:S56–68.
 16. Doré-Savard L, Otis V, Belleville K, Lemire M, Archambault M, Tremblay L, et al. Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13774.
 17. Wahl RL, Cody R, Hutchins G, Mudgett E. Positron-emission tomographic scanning of primary and metastatic breast carcinoma with the radiolabeled glucose analogue 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose. *N Engl J Med*. 1991Jan.17;324(3):200.
 18. Iida H, Miura S, Shoji Y, Ogawa T, Kado H, Narita Y, et al. Noninvasive quantitation of cerebral blood flow using oxygen-15-water and a dual-PET system. *J Nucl Med*. 1998Oct.;39(10):1789–98.
 19. van Waarde A, Cobben DCP, Suurmeijer AJH, Maas B, Vaalburg W, de Vries EFJ, et al. Selectivity of 18F-FLT and 18F-FDG for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *J Nucl Med*. 2004Apr.;45(4):695–700.
 20. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006Dec.;1092:385–96.
 21. Minn H, Clavo AC, Grénman R, Wahl RL. In vitro comparison of cell proliferation kinetics and uptake of tritiated fluorodeoxyglucose and L-methionine in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *J Nucl Med*. 1995Feb.;36(2):252–8.
 22. Viel T, Talasila KM, Monfared P, Wang J, Jikeli JF, Waerzeggers Y, et al. Analysis of the Growth Dynamics of Angiogenesis-Dependent and -Independent Experimental Glioblastomas by Multimodal Small-Animal PET and MRI. *J Nucl Med*. 2012Jul.;53(7):1135–45.
 23. Arbizu J, Tejada S, Marti-Climent JM, Diez-Valle R, Prieto E, Quincoces G, et al. Quantitative volumetric analysis of gliomas with sequential MRI and ¹¹C-methionine PET assessment: patterns of integration in therapy planning. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012May;39(5):771–81.
 24. Sadeghi N, Salmon I, Decaestecker C, Levivier M, Metens T, Wikler D, et al. Stereotactic comparison among cerebral blood volume, methionine uptake, and histopathology in brain glioma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007Mar.;28(3):455–61.

25. Kato T, Shinoda J, Oka N, Miwa K, Nakayama N, Yano H, et al. Analysis of 11C-methionine uptake in low-grade gliomas and correlation with proliferative activity. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008Nov.;29(10):1867–71.
26. Giammarile F, Cinotti LE, Jouvet A, Ramackers JM, Saint Pierre G, Thiesse P, et al. High and low grade oligodendrogliomas (ODG): correlation of amino-acid and glucose uptakes using PET and histological classifications. *J Neurooncol.* 2004Jul.;68(3):263–74.
27. Nuñez R, Macapinlac HA, Yeung HWD, Akhurst T, Cai S, Osman I, et al. Combined 18F-FDG and 11C-methionine PET scans in patients with newly progressive metastatic prostate cancer. *J Nucl Med.* 2002Jan.;43(1):46–55.
28. Dankerl A, Liebisch P, Glatting G, Friesen C, Blumstein NM, Kocot D, et al. Multiple Myeloma: Molecular Imaging with 11C-Methionine PET/CT--Initial Experience. *Radiology.* 2007Feb.;242(2):498–508.
29. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Takahashi T, Iwata R, et al. Methionine uptake by tumor tissue: a microautoradiographic comparison with FDG. *J Nucl Med.* 1995Mar.;36(3):484–92.
30. Singhal T, Narayanan TK, Jain V, Mukherjee J, Mantil J. 11C-L-methionine positron emission tomography in the clinical management of cerebral gliomas. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging.* 2008Jan.;10(1):1–18.
31. Caroli P, Nanni C, Rubello D, Alavi A, Fanti S. Non-FDG PET in the practice of oncology. *Indian J Cancer.* 2010Apr.;47(2):120–5.
32. Lindholm P, Lapela M, Någren K, Lehtikoinen P, Minn H, Jyrkkö S. Preliminary study of carbon-11 methionine PET in the evaluation of early response to therapy in advanced breast cancer. *Nucl Med Commun.* 2009Jan.;30(1):30–6.
33. Biganzoli L, Wildiers H, Oakman C, Marotti L, Loibl S, Kunkler I, et al. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). *Lancet Oncol.* 2012Apr.;13(4):e148–60.
34. Kelloff GJ, Bast RC, Coffey DS, D'Amico AV, Kerbel RS, Park JW, et al. Biomarkers, surrogate end points, and the acceleration of drug development for cancer prevention and treatment: an update prologue. *Clin Cancer Res.* 2004Jun.1;10(11):3881–4.
35. Nahmias C, Wahl LM. Reproducibility of standardized uptake value measurements determined by 18F-FDG PET in malignant tumors. *J Nucl Med.* 2008Nov.;49(11):1804–8.

36. Krak NC, Boellaard R, Hoekstra OS, Twisk JWR, Hoekstra CJ, Lammertsma AA. Effects of ROI definition and reconstruction method on quantitative outcome and applicability in a response monitoring trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005Mar.;32(3):294–301.
37. Rosario BL, Weissfeld LA, Laymon CM, Mathis CA, Klunk WE, Berginc MD, et al. Inter-rater reliability of manual and automated region-of-interest delineation for PiB PET. *Neuroimage*. 2011Apr.1;55(3):933–41.

Matériels et méthodes supplémentaires.

Évaluation de l'effet analgésique de différentes molécules connues et d'agonistes des récepteurs neurotensinergiques.

La structure de la neurotensine ainsi que celle des agonistes neurotensinergiques utilisés dans notre étude sont énumérées dans le tableau 8. La voie d'administration et les paramètres temporels des tests suivant l'injection ont été déterminés en fonctions des propriétés des composés telles que déterminées dans des expériences précédentes ou telles que décrites dans la littérature (voir tableau 9). Chacune des drogues a été injectée à un groupe d'animaux différents et ce, à un stade précoce du développement de la douleur cancéreuse (Jour 14, appelé Early sur les graphiques) et à un stade avancé (Jour 18, appelé Late dans les graphiques). Chaque animal a donc reçu 2 injections d'une même drogue, à 4 jours d'intervalle. Nous ne croyons pas que la première injection ait pu avoir un impact sur les résultats enregistrés suite à la seconde injection au jour 18. Dans la majorité des cas, l'expérimentateur était aveugle au traitement. Pour chaque composé, l'effet analgésique a été comparé au groupe véhicule (saline ou autre) approprié (même voie d'administration et volume). Pour les injections sous-cutanées, un volume de 1 ml/kg a été administré alors que pour les injections intrapéritonéales, un volume de 5 ml/kg a été injecté. Finalement, un volume de 25 µl a été utilisé pour toutes les injections intrathécales. Le nabilone a été administré par gavage à raison de 5 ml/kg.

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------|------|
| Neurotensine (NT) | pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH | non |
| NT69L | [N-ethyl-Arg8, L-Lys9, L-neo-Trp11, tert-Leu12]NT(8-13) | non |
| JMV-2007 | His-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Alanylil-OH | non |
| JMV-431 | Boc-Arg-Arg-Pro-Tyr-psi(CH ₂ NH)Ile-Leu | NTS2 |
| JMV-2009 | His-Lys-Lys-Sil-Tyr-Ile-Leu-OH | non |

Tableau 8. Structure des différents agonistes neurotensinergiques

| | | | | |
|------------------|------------------|-----------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Morphine sulfate | Sous-cutanée | 3 mg/kg | 30 minutes | (Medhurst et al. 2002) |
| Amitriptylline | Intrapéritonéale | 10 mg/kg | 120 minutes | (El Mouedden et al. 2007) |
| Tramadol | Intrapéritonéale | 15 mg/kg | 30 minutes | (Cannon 2010) |
| Nabilone | Voie orale | 1 mg/kg | 60 minutes | (Guindon 2012) et courbe dose-réponse réalisée par K. Belleville. |
| NT69L | Intrathécale | 5 µg/kg | 30 minutes | (Roussy et al. 2008 ; Guillemette et al. 2012) |
| JMV-2007 | Intrathécale | 90 µg/kg | 30 minutes | Expériences précédentes en douleur aigue par P. Tétreault (non-publié). |
| JMV-431 | Intrathécale | 90 µg/kg | 30 minutes | (Doré-Savard et al. 2008 ; Roussy et al. 2009) |
| JMV-2009 | Intrathécale | 300 µg/kg | 30 minutes | Expériences précédentes en douleur neuropathique et inflammatoire par P. Tétreault (non publié) |

Tableau 9. Liste des composés injectés en fonction de la dose et de la voie d'administration.

Résultats supplémentaires : Analgésie neurotensinergique en douleur cancéreuse.

Nous avons ensuite évalué le potentiel analgésique de deux agonistes neurotensinergiques non-sélectifs dans notre modèle; le NT69L et le JMV-2007 (Non montré). Le NT69L a montré un potentiel analgésique en douleur aiguë (Tyler-McMahon et al., 2000), tonique (Roussy et al., 2008) et chronique (Guillemette et al., 2012). À la dose utilisée, le NT69L ne parvient pas à améliorer la condition de douleur des animaux dans notre modèle. Un effet analgésique peu reproductible d'un animal à l'autre a pu être observé au jour 14 à l'aide du test de von Frey. Par contre, aucun effet n'est recensé au DWB. Le même type de résultat a été obtenu pour le JMV-2007 alors que la variabilité au jour 14 en allodynie, ne permet pas de tirer de conclusion.

Une seconde série d'agonistes a été utilisée afin de tenter de démasquer l'effet anti-allodynique des analogues neurotensinergiques dans notre modèle (Figure 16A-B). Le JMV-431 est un agoniste sélectif NTS2 qui a démontré des effets antinociceptifs chez la souris dans un modèle de douleur tonique (Roussy et al. 2009), en douleur thermique aiguë chez le rat (Sarret et al. 2005; Doré-Savard et al. 2008) et en douleur viscérale chez la souris. En douleur cancéreuse, le JMV-431 exerce un effet anti-allodynique au stade précoce du développement de l'hypersensibilité (Jour 14, noté Early). Par contre, aucun effet significatif n'a été observé au stade tardif (Jour 18, noté Late). Le JMV-2009, un agoniste non-sélectif testé en douleur aiguë, tonique et chronique neuropathique dans notre laboratoire (Tétreault P., non-publié), a démontré un effet anti-allodynique significatif autant au stade précoce qu'au stade tardif.

Afin de mieux caractériser l'allodynie induite par le modèle de métastases osseuses, nous avons évalué le potentiel anti-allodynique de médicaments connus et répandus en clinique pour différents syndromes de douleur (Figure 16C-F). C'est ainsi que nous avons observé qu'une injection de 3 mg/kg de morphine n'a pas été en mesure de renverser de façon significative l'allodynie mécanique chez les animaux cancéreux, que ce soit au stade précoce du développement de la douleur (jour 14) qu'au stade avancé (jours 18). Cependant, l'antidépresseur amitriptylline arrive à renverser la douleur cancéreuse dans

notre modèle au stade tardif seulement. En effet, une dose de 10 mg/kg améliore de façon reproductible l'allodynie mécanique induite par la tumeur au jour 18. Le tramadol ne rétablit pas non plus l'hypersensibilité mécanique de manière significative chez nos animaux. Une élévation du seuil de retrait moyen est cependant observée de manière constante chez tous les animaux, particulièrement au stade tardif. Finalement, nous avons utilisé le cannabinoïde synthétique Nabilone, prescrit chez l'humain entre autres dans certains cas de fibromyalgie et de douleur neuropathique, est parvenu à renverser presque totalement l'allodynie au stade précoce (non significatif) et au stade avancé.

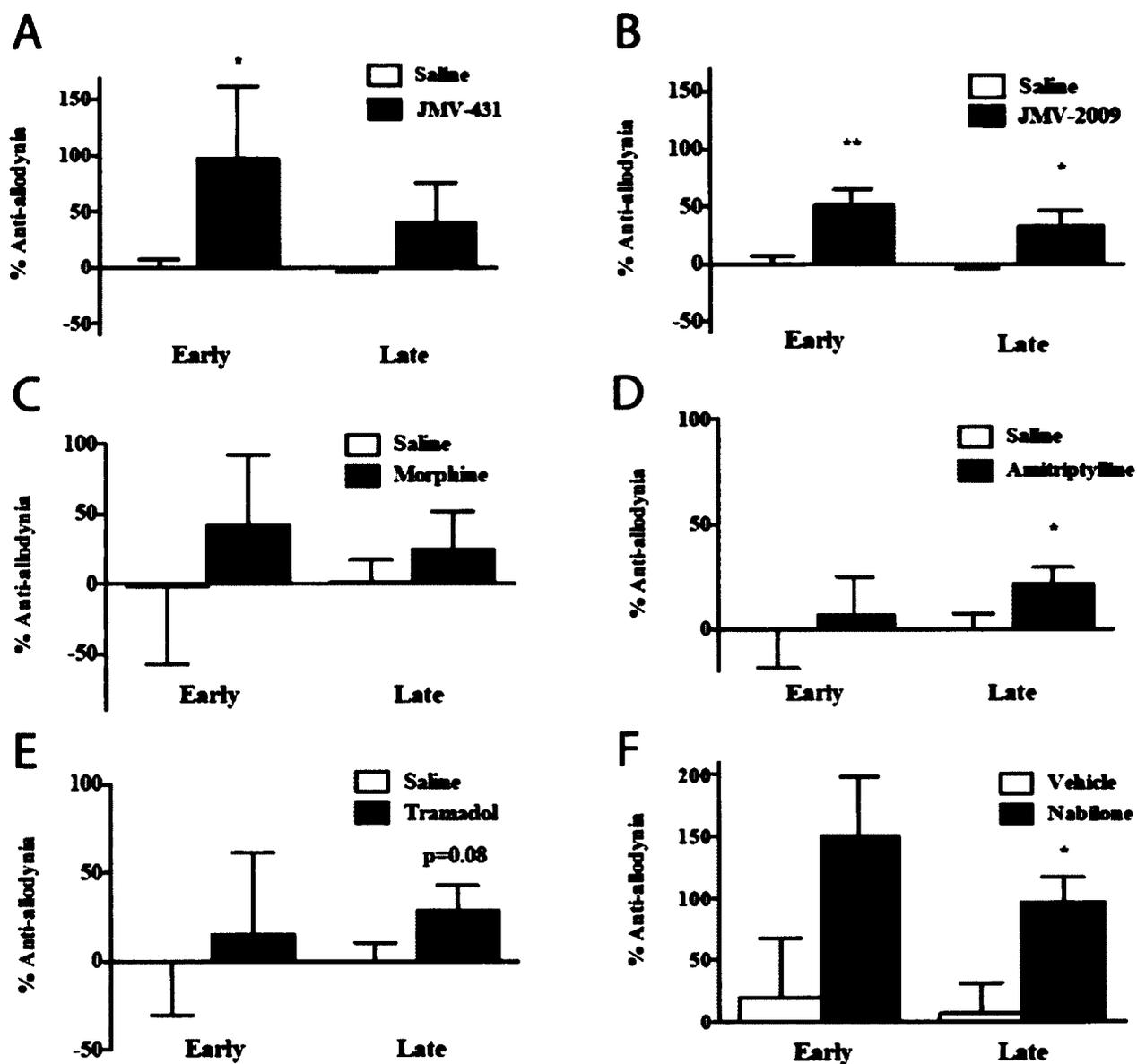


Figure 16. Effet des substances analgésiques neurotensinergiques et de référence sur l'allodynie mécanique dans notre modèle. A) JMV-431 n = 7 ; Saline n = 11 B) JMV-2009 n = 9 ; Saline n = 11 C) Morphine n = 7 ; Saline n = 7 D) Amitriptylline n = 8 ; Saline n = 7 E) Tramadol n = 9 ; Saline n = 7 ; F) Nabilone n = 6-7 ; Véhicule n = 5-6.

Le test de distribution pondérale dynamique (DWB) donne aussi des résultats intéressants quant à la capacité des composés à renverser les changements de distribution pondérale suite au développement d'une tumeur osseuse. En effet, le JMV-431 (Figure 17A) renverse significativement le changement de posture au stade précoce mais pas au stade avancé. LE JMV-2009 (Figure 17B) lui, contrairement à ce qui est observé en allodynie, n'a aucun effet au test du DWB. La morphine (Figure 17C) induit un retour significatif du poids sur la patte cancéreuse au stade tardif. L'amitriptylline (Figure 17D) n'a pas entraîné d'amélioration, voir même une aggravation du phénomène de changement postural. C'est également le cas pour le tramadol (Figure 17E), qui semble causer une aggravation de ce symptôme au jour 14. Finalement nous n'avons pu démontrer d'effet significatif avec le nabilone (Figure 17F). Par contre, nous pensons pouvoir attribuer cette absence de significativité statistique par le petit nombre d'animaux dans le groupe véhicule ($n = 5$). Le JMV-431 semble donc avoir un potentiel intéressant pour le soulagement de la douleur induite par une tumeur osseuse. L'agoniste non-sélectif JMV-2009 a lui aussi donné de bons résultats en douleur aiguë et en douleur chronique neuropathique (Tetreault P. et al., 2012). Cet agoniste a aussi l'avantage de ne pas engendrer les effets secondaires propres aux agonistes du récepteur NTS1 tels que l'hypothermie ou les déficits moteurs. Il peut donc être administré à plus forte dose. Ainsi, une dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.t. provoque un renversement de l'allodynie significatif au jour 14 et a jour 18. Par contre, le JMV-2009 n'a pas amélioré la situation en distribution pondérale chez les rats. Le JMV-2009 semble donc en mesure de renverser l'allodynie mécanique en douleur cancéreuse mais pas les modifications de distribution pondérale.

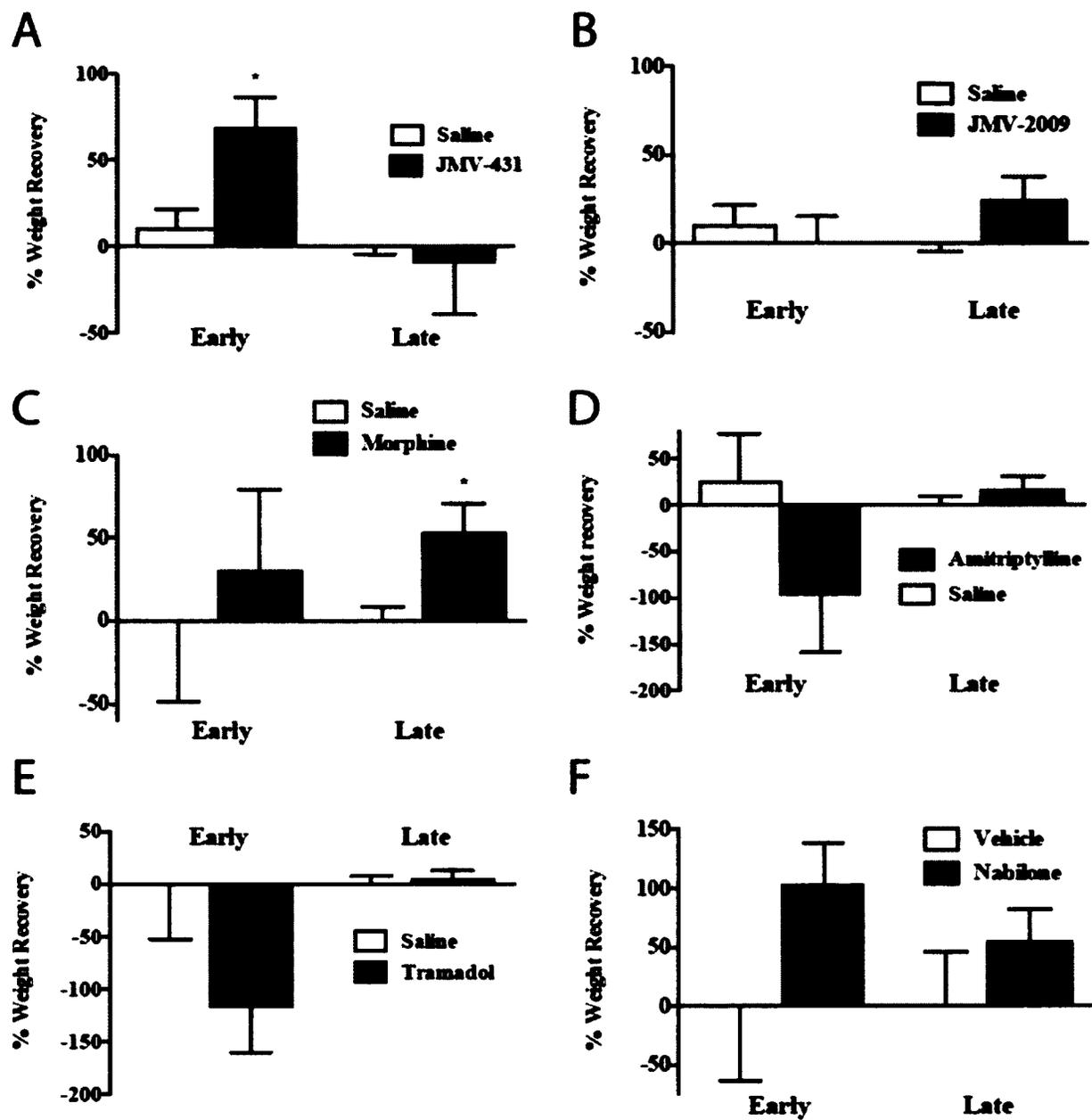


Figure 17. Effets des composés analgésiques sur la distribution pondérale dynamique. Les données sont exprimées en pourcentage de retour aux valeurs de base (% Weight Recovery).

Discussion

Les patients atteints d'un cancer du sein ou de la prostate en stade avancé ont de fortes chances de développer des métastases osseuses. Ils devront par la suite composer avec des douleurs intenses à modérées, continues ou spontanées, qui demeurent encore aujourd'hui résistantes aux traitements actuels. Les opiacés, dont la morphine et ses dérivés, restent le premier choix en matière de traitement pour ces douleurs. Par contre, les doses requises pour atteindre un soulagement satisfaisant provoquent des effets secondaires invalidants, que ce soit de la sédation, de la constipation ou des nausées. Malgré l'intensification de la recherche dans le domaine de la douleur, très peu de nouveaux traitements ont vu le jour au cours des dernières années. Cela est dû en partie au fait que les modèles utilisés pour l'évaluation des traitements ne parviennent pas à mimer la situation retrouvée chez l'humain. De plus, les paramètres examinés ne nous donnent pas l'information permettant un transfert direct à l'Homme. C'est en ayant à l'esprit cette problématique que nous avons créé un modèle de douleur cancéreuse osseuse qui se rapproche autant que possible de la réalité clinique. De plus, nous avons tenté d'effectuer une caractérisation complète du modèle, de la tumeur osseuse aux modifications neurochimiques en passant par le remodelage osseux, afin de mettre en relation la maladie et le syndrome douloureux qui y est associé. Nous avons combiné de nouvelles techniques d'évaluation comportementale avec une approche d'imagerie médicale innovante afin de se doter d'outils permettant de dresser un portrait global de l'effet des traitements étudiés. Nous sommes confiants qu'avec le bagage accumulé, nous poursuivrons notre progression dans l'espoir d'élaborer une solution thérapeutique qui améliorera la qualité de vie des patients aux prises avec de la douleur osseuse cancéreuse.

1. Un modèle de douleur cancéreuse pour l'évaluation de nouveaux traitements analgésiques.

D'autres modèles dans la littérature utilisent une procédure chirurgicale apparentée à la nôtre (Schwei et al. 1999; Medhurst et al. 2002; R.-X. Zhang et al. 2005; Mao-Ying et al. 2006). La profondeur de la caractérisation effectuée dans ces modèles est variable, et un

petit nombre de ces études comparent à la fois des informations traitant de la douleur cancéreuse et de la progression de la maladie elle-même. Toutefois, certaines exceptions existent. Une étude de Sabino et al. a évalué l'efficacité d'un nouvel inhibiteur sélectif de COX-2 dans le modèle décrit par Schwei (injection de cellules NCTC2472) (Sabino et al. 2002). Une fois l'effet analgésique démontré, les auteurs se sont attardés à l'effet du composé sur la croissance tumorale et ont observé des différences suite au traitement. De plus, les scores de résorption osseuse étaient diminués de plus de 50% en raison d'une diminution de l'ostéoclastogenèse. Ce type d'enquête complète n'a que peu été reproduit dans la littérature. Certaines études ont montré une réduction de la douleur suite à un traitement, tel que les bisphosphonates, qui ne visait pas nécessairement les processus nociceptifs (Sevcik et al. 2004; Walker et al. 2002; Hald, Hansen, et al. 2009). Le potentiel de modification de la maladie était évident dans ces cas particuliers et était couplé à un effet analgésique intéressant, ce qui faisait de ces traitements des possibilités encore plus intéressantes. Par contre, il est important de ne pas sous-estimer les effets possibles d'un traitement à l'essai. Il est donc essentiel de se doter d'outils permettant une évaluation de plusieurs paramètres liés à la douleur et au cancer lui-même à l'intérieur d'une même étude, dans le même laboratoire, sur les mêmes animaux. Le modèle NCTC2472 chez la souris a fait l'objet d'une caractérisation très diversifiée au cours des années. Mais force est de constater qu'elle a été réalisée par petits morceaux et par plusieurs groupes de recherches différents. Nous nous sommes donnés pour objectif de se doter de tous les outils nécessaires à l'évaluation multiparamétrique de chaque traitement que nous tenterons de mettre de l'avant dans l'avenir et ce, afin de ne pas passer outre de possible effets, positifs ou non pour l'animal et à fortiori pour le patient, qui n'auraient pas été détectés avec les méthodes plus conventionnelles ou simplifiées.

Chaque modèle comporte un certain nombre de limitations qui ne le rendent pas exactement conforme à la réalité humaine et clinique. Le modèle présenté dans cette thèse comporte l'injection de cellules cancéreuses dans le fémur droit. Il est important de noter qu'aucune arthrotomie n'est effectuée au cours de la chirurgie, contrairement à la majorité des modèles intra-fémoraux chez la souris. Nous avons jugé que cette procédure était invasive et risquait fortement d'influencer notre évaluation de la douleur chez l'animal. Le

modèle d'injection que nous utilisons, où l'insertion de l'aiguille a lieu dans une cavité latérale sur le fémur, évite les problèmes potentiels liés à l'arthrotomie. Cette procédure chirurgicale court-circuite le processus métastatique en introduisant les cellules directement dans l'os. Il n'y aura donc pas détachement du site primaire des cellules compétentes, ni extravasation, ni chimiotactisme vers un site distant propice à l'implantation des cellules. Certains modèles utilisent plutôt l'injection intracardiaque comme voie d'inoculation (Blouin, Baslé, and Chappard 2005). Ce type de modèle permet une dissémination dans tout le corps et peut entraîner des métastases à certains organes vitaux tels que le foie et les poumons. Cela peut devenir problématique lorsqu'on fait des études longitudinales sur les métastases osseuses, dont la progression est parfois plus lente. Pour remédier à cet inconvénient, des sous-clones ont été produits ayant une meilleure affinité pour l'os que pour les autres organes comme les MDA-MB-231-BO (Bloom et al. 2011). Cependant, l'évaluation de la douleur chez des animaux implantés de cette façon devient problématique avec les méthodes dont nous disposons actuellement. En effet, malgré toute la volonté de passer à des méthodes différentes, l'évaluation de la douleur repose encore sur les différences qu'il peut exister entre une patte lésée et la patte controlatérale. De plus, les réactions d'un animal qui aurait mal aux deux pattes postérieures, aux pattes antérieures et par exemple au dos, ne seront pas reproductibles et difficilement analysables. Il est donc important, si la douleur est un facteur dans l'étude, de circonscrire l'atteinte à un seul membre. De plus, il est possible de trouver des études ayant utilisé le même modèle cellulaire mais avec des modes d'implantation différents (intra-cardiaque vs injection intra-osseuse localisée). Dans ce cas, on peut voir que malgré des chronologies différentes, les tumeurs osseuses se ressemblent beaucoup, tant au niveau histologique que radiologique (Bloom et al. 2011).

Une différence majeure que nous avons pu observer dans notre modèle par rapport aux autres modèles présents dans la littérature est le patron d'expression de certains marqueurs neurochimiques. En effet, si on se compare avec le modèle de douleur cancéreuse de Schwei ou de Medhurst, on peut voir que nous n'avons pas observé de façon quantitative une augmentation du marquage astrocytaire dans notre modèle, alors que les études précédentes avaient toutes observé ce phénomène (Schwei et al. 1999 ; Medhurst et

al. 2002). Cela peut être causé par des différences entre les modèles, mais aussi par le temps auquel nos expériences ont été réalisées. En effet, les observations neurochimiques sont habituellement faites à un stade avancé de la croissance tumorale alors que nous avons fait les nôtres au jour 14, un moment où nous nous considérons encore à un stade précoce. De plus, nous sommes parmi les premiers à montrer une plasticité au niveau microglial. En effet, nous constatons un marquage plus important en utilisant le marqueur Iba1 alors qu'en utilisant le marqueur OX-42, il n'était pas possible de voir d'activation. Les caractéristiques morphologiques de la microglie que nous observons dans la moelle épinière de nos animaux cancéreux ne laissent pas penser non plus à une forte activation microgliale, mais plutôt à une augmentation du nombre de cellules. Ce paramètre n'avait jamais vraiment été observé et il sera intéressant de pousser plus à fond le patron d'activation de la microglie et des astrocytes dans notre modèle, et de faire un suivi à plusieurs temps.

C-fos est un marqueur d'activité neuronale qui est régulièrement utilisé dans le domaine de la douleur. La première démonstration de l'augmentation de son expression suite à une stimulation douloureuse remonte à plus de 20 ans (Bullitt 1989). Dans cette étude et plusieurs qui ont suivi, un marquage prononcé a été observé dans les lames superficielles mais aussi dans les lames plus profondes, particulièrement dans les cas de douleur mécanique, qui active des neurones dans un plus grand nombre de couches (I-VI et IX-X) (DeLeo et al. 1991). Dans le cadre de notre étude, nous avons également observé une augmentation du marquage c-fos dans une variété de couches au niveau de la moelle épinière. Par contre, nous n'avons pu observer de variation dans les couches superficielles. En effet, les lames I-II, qui en principe reçoivent l'influx nociceptif provenant de la périphérie, démontraient un marquage c-fos près du niveau de base. Nous avons de la difficulté à nous expliquer ce phénomène et nous espérons que la caractérisation neurochimique de notre modèle à plusieurs temps nous permettra de répondre aux questions soulevées. À la lumière de ces observations, nous croyons aussi qu'il est fort probable qu'une partie des modifications observées soient attribuables aux modifications biomécaniques subies par l'animal, en raison de la douleur induite par la tumeur, et à un changement dans sa posture, tel que cela a été observé dans le cerveau de rats ayant subit

une labyrintectomie (Cirelli et al. 1996). Il est pour le moment impossible de déterminer quelle proportion de l'expression de c-fos est attribuable à l'activation des nocicepteurs, des interneurones reliés et des motoneurones.

Il était important pour nous de choisir le fémur comme site d'implantation en raison de la prévalence de métastases à cet os comparativement aux autres os longs du corps. En effet, 30% des patients porteurs de métastases osseuses auront une tumeur au fémur alors que c'est le cas pour seulement 3% des patients lorsqu'on parle du tibia et moins de 1% pour les pieds et les mains. La colonne vertébrale arrive en tête avec 60%, mais elle représente un défi technique colossal en terme de chirurgie d'implantation et de mesure de la douleur par la suite. La première procédure chirurgicale consistant en l'injection de cellules dans un corps vertébral a été publiée en 2011 seulement (Liang et al. 2011). Par conséquent, l'injection directe dans le canal médullaire d'un os long, en particulier le fémur, demeure l'approche que nous privilégions dans notre modèle de douleur cancéreuse.

Le choix des cellules MRMT-1 ne s'est pas imposé naturellement pour nous lorsque nous avons élaboré le modèle. Notre première idée était d'implanter un ostéosarcome syngénique UMR-106 (Forrest et al. 1985) afin d'obtenir un modèle de cancer primaire dont les cellules sont mieux caractérisées. De plus, un ostéosarcome primaire chez le rat est toujours absent de la littérature et un tel modèle aurait eu un caractère assez unique. Par contre, en plus de certaines difficultés techniques avec ces cellules et à la lumière d'une étude approfondie de la littérature, il nous est rapidement apparu qu'il serait plus pertinent de créer un modèle basé sur des cellules de cancer mammaire au potentiel fortement métastatique. La prévalence d'une telle affection dans la population est beaucoup plus élevée qu'un ostéosarcome primaire (Siegel, Naishadham, and Jemal 2012), amenant des coûts financiers et sociaux bien plus importants. Par contre, la caractérisation des cellules MRMT-1 n'est pas très exhaustive. En effet, suite à la création de ce modèle cellulaire à l'aide de l'agent carcinogène 3-méthylcholanthrène, très peu d'études se sont intéressées aux caractéristiques propres de ces cellules, outre le fait qu'elles produisent spontanément des métastases à des sites distants tels que les poumons (Harada 1975). Ces cellules sont sensibles à la prolactine (Harada 1976) et au stress chirurgical, qui augmente

le nombre de métastases (Tanemura et al. 1982; Takekoshi et al. 1984). Ce dernier effet du stress est corticoïdes-dépendant (Deguchi et al. 1998). Plus récemment, il a été démontré que les MRMT-1 expriment la métalloprotéinase MT1-MMP, impliquée dans le développement des métastases (Temma et al. 2009). Nous avons, ainsi que d'autres groupes de recherche, démontré leur potentiel à activer l'ostéoclastogenèse *in vivo*. Cela a été confirmé par une étude *in vitro* où le milieu conditionné par les cellules MRMT-1 induit la prolifération, la différenciation et la maturation des monocytes en culture en ostéoclastes (Salamanna et al. 2012). Cependant, les caractéristiques qui sont normalement établies afin de décrire les cellules mammaires telles que l'expression du récepteur à l'estrogène, à la progestérone ou encore du proto-oncogène HER2 sont encore inconnues. Des expériences sont actuellement en cours dans le laboratoire afin de connaître le phénotype de nos cellules par rapport à ces 3 facteurs. Celles-ci nous permettront de mieux discuter du potentiel migratoire et invasif de nos cellules dans l'avenir.

2. Imagerie médicale d'un modèle préclinique.

L'imagerie apporte de l'information anatomique et fonctionnelle qui est difficile voir impossible à obtenir sans euthanasier l'animal. Cela est particulièrement intéressant quand le modèle étudié progresse de façon importante dans le temps et que des acquisitions répétées sont nécessaires afin de suivre le développement du modèle. Nous avons cherché à développer une approche utilisant des outils d'imagerie sophistiqués afin de pouvoir établir une corrélation directe entre les paramètres liés à la douleur, à la progression et au métabolisme de la tumeur ainsi qu'au remodelage osseux.

Notre stratégie vise à combiner les techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM), de tomographie d'émission par positron (TEP), et la tomodensitométrie osseuse afin d'obtenir un portrait complet de la situation au niveau de l'os.

L'IRM permet une visualisation haute résolution des tissus mous de l'organisme en plus de pouvoir donner, à l'aide d'agents de contraste, des informations sur la perfusion à l'intérieur d'un organe ou d'un tissu. Il nous a ainsi été possible de suivre le développement

de la tumeur dans le temps à partir du moment même de son apparition. En effet, la tumeur a été détectée aussi tôt que le jour 8 chez certains animaux. D'ailleurs, nous avons été en mesure de détecter la tumeur de façon constante entre 3 et 5 jours avant l'apparition de la douleur en comportement. Ce genre de constat ouvre la voie à un dépistage beaucoup plus précoce de l'apparition de métastases osseuses chez les patients à risque ainsi qu'à un suivi plus rapproché des patients ayant subi une intervention chirurgicale ou des séances de radio/chimiothérapie pour un cancer primaire. L'IRM étant une technique peu invasive et sans radiation, la disponibilité des appareils et les coûts sont en fait les seuls facteurs limitant une utilisation élargie de l'IRM en oncologie. Une détection précoce des métastases pourrait également avoir un impact important dans la gestion de la douleur maligne. En effet, cela pourrait permettre d'introduire un traitement plus tôt dans le développement de la tumeur. L'utilisation de bisphosphonates de façon préventive est déjà répertoriée dans la littérature (Coleman 2007a). Il reste à démontrer que l'introduction d'un traitement analgésique, quel qu'il soit, au moment de la détection de la tumeur à l'IRM mais avant l'apparition de la douleur, pourrait retarder l'apparition de celle-ci, en ralentir la progression (et surtout peut-être éviter son évolution vers un état chronique) et ainsi en réduire l'impact sur la vie du patient. Dans notre modèle, un analgésique tel que la morphine ou un agoniste neurotensinergique pourrait être administré à partir des jours 8 à 10 afin de devancer l'apparition de la douleur. Ce type de traitement sera possiblement évalué au laboratoire dans le futur.

L'IRM aura aussi le potentiel de détecter une modification dans le patron de croissance de la tumeur. En effet, étant donné les possibles effets de la neurotensine sur les cellules cancéreuses, il sera intéressant d'évaluer si, en parallèle de l'évaluation de la douleur, les agonistes ralentissent ou accélèrent la croissance tumorale. Si on se fie aux effets de la morphine qui peut soit augmenter ou diminuer la croissance de la tumeur selon le schéma expérimental et selon différentes études, il est évident qu'il deviendra important d'évaluer aussi les effets des composés neurotensinergiques.

La tomographie d'émission par positrons produit des images à caractère fonctionnel et métabolique des tissus étudiés. À l'aide du traceur le plus répandu, le ^{18}F -

fluorodésoxyglucose (FDG), nous avons pu visualiser la tumeur en terme de consommation relative de glucose par les cellules. Ce paramètre est un indice important qu'un processus néoplasique est en cours dans l'organe à l'étude. La grande sensibilité du TEP au FDG en a fait la technique de 1^{er} choix en clinique. Par contre, les tumeurs ne sont pas les seules cellules à consommer plus de glucose. Toute blessure en réparation ou source d'inflammation est susceptible de capter plus de FDG. Ainsi, il a été difficile, voir impossible d'isoler seulement la tumeur sans inclure les zones correspondant seulement à de l'inflammation dans nos régions d'intérêt. Il est donc fort probable que l'inflammation induite par la tumeur soit autant responsable de l'augmentation des paramètres observés que la tumeur elle-même. Pour la détection de la tumeur, ce n'est pas un problème en soit. Mais pour l'étude de la douleur, nous jugions utile d'avoir sous la main un traceur qui nous permettrait de faire abstraction de cette inflammation afin d'évaluer le métabolisme tumoral seulement.

La méthionine marquée au carbone 11 était plus susceptible de répondre à ce besoin. En effet, la consommation accrue en acides aminés est plus spécifique à une tumeur et est systématiquement augmentée dans un plus grand nombre d'entres elles comparativement au FDG. Certaines tumeurs diminuent leur consommation en glucose ce qui les rend plus difficiles à détecter dans un tissu comme le cerveau (Singhal et al. 2008). Toutefois, la méthionine s'est montrée très efficace dans la détection d'astrocytomes en raison du faible niveau de base dans le cerveau. L'utilité d'un tel traceur et les conditions idéales d'acquisition des images ne sont pas connues pour une tumeur osseuse puisqu'il s'agit, à notre connaissance, de la première étude utilisant la 11C-méthionine dans ce type de tumeur.

Nous avons pu observer que l'accumulation de 11C-méthionine était bien augmentée dans la tumeur osseuse au jour 15 et au jour 18. Il semble aussi assez évident que cette même méthionine ne s'accumule pas ou très peu dans le tissu environnant, incluant l'inflammation péri-tumorale s'étendant au muscle. Mais les images ne nous permettent pas de délimiter la tumeur avec précision. C'est que le rapport entre les niveaux de captage dans la tumeur et le muscle n'est pas suffisamment élevé pour tracer une ligne délimitant la

tumeur. C'est là que la co-registation entre les images TEP et IRM entre en scène. Ce recalage nous permet de tracer la région d'intérêt comprenant seulement la tumeur à partir des images IRM avec agent de contraste. Les images IRM avec Gd-DTPA peuvent servir de repère étant donné la grande précision de l'information anatomique fournie. Il est donc possible d'exclure en TEP les zones qui ne font pas partie de la tumeur et ainsi faciliter l'analyse quantitative des images TEP.

Il faut aussi dire qu'une mise au point plutôt minimale a été effectuée afin de définir les paramètres d'acquisition des images avec les différents traceurs. Pour la méthionine, l'acquisition du volume est amorcée 15 minutes après l'injection du traceur, ce qui a produit les images que nous avons. Il n'est pas exclu qu'il aurait été possible d'éliminer du bruit de fond en procédant à l'acquisition plus tôt ou encore plus tard dans l'expérience. Les niveaux de méthionine dans le tissu sont stables après 2 minutes. Le temps que nous puissions attendre après l'injection de l'acide aminé est cependant limité par la demi-vie du carbone 11 qui est de seulement 20,4 minutes. Aucune analyse des cinétiques d'entrée et de sortie n'a été réalisée, ce qui aurait pu nous donner plus de renseignements sur la distribution du traceur dans les tissus. Une telle analyse nous aurait notamment permis de choisir le moment optimal où le traceur est retenu dans la tumeur de façon préférentielle par rapport au muscle squelettique environnant.

Le bruit de fond n'a pas été un problème significatif dans la visualisation des images obtenues à l'aide du traceur ^{18}F -fluorure de sodium (NaF). Le fluorure (F^-) étant très sélectif pour l'os, aucun bruit de fond n'est observé sur les images et il est facile de définir hors de tout doute à quel endroit il y a captage du traceur. La co-registation est tout de même essentielle à l'interprétation des images. En effet, aucune information anatomique ne peut être extraite des images au NaF et il devient important de coupler la TEP à une autre modalité ; l'IRM dans notre cas. À l'aide de la co-registation, nous avons pu observer que la tumeur induisait un remodelage osseux important, lytique autant que sclérotique. Une forte diminution du captage est observée où l'os est plus attaqué, conséquence de l'accumulation des dommages lytiques subis par le fémur. Une activité blastique est ensuite observée sur le pourtour proximal de la tumeur, où l'os est dégradé mais possède encore la

capacité et les populations cellulaires lui permettant de lutter contre cette action lytique. Ces deux types de remodelage sont probablement co-localisés au stade où la tumeur est confinée à une plus petite région du canal médullaire (jour 15) et où la matrice osseuse possède encore un niveau d'organisation suffisant.

La question que l'on peut se poser est : comment ces modalités d'imagerie s'inscrivent-elles dans l'évaluation d'un modèle de douleur cancéreuse? Nous tentons actuellement de mettre en œuvre une procédure qui nous aidera à révéler les effets, autres qu'analgésiques, des médicaments actuellement utilisés en clinique ainsi que ceux encore en évaluation pré-clinique. Par exemple, comment la morphine administrée de façon chronique influence-t-elle le volume de la tumeur, son métabolisme ou encore la résorption osseuse? Est-ce que des inhibiteurs de COX-2 peuvent jouer un rôle tant sur la douleur que sur l'évolution de la tumeur ? Voilà des questions auxquelles il est difficile de répondre pour l'instant malgré la présence de certaines études ayant abordé le sujet.

À titre d'exemple, l'analgésique le plus puissant et le plus répandu, la morphine, augmente le nombre de métastases pulmonaires chez les rats à forte dose (Simon and Arbo 1986). Plusieurs chercheurs se sont penchés sur ces effets. La première hypothèse soulevée stipulait que la morphine avait un effet immunosuppresseur généralisé chez l'animal, ce qui facilitait le développement des métastases (Yeager and Colacchio 1991). De plus, la morphine augmente l'angiogenèse, augmentant ainsi la prolifération de certaines tumeurs (Gupta et al. 2002) via la transactivation du récepteur VEGF (Gach et al. 2011). Dans les métastases osseuses, la morphine accélère aussi la dégradation osseuse en activant les ostéoclastes de manière indirecte (King et al. 2007). Par contre, des données contradictoires existent sur ces phénomènes alors que dans un modèle de mélanome métastatique, le groupe de Sasamura a observé une diminution de la croissance tumorale et des métastases suite à l'administration chronique de morphine (Sasamura et al. 2002). Le phénomène d'angiogenèse a été diminué et la tumeur réduite par une relâche continue sous-cutanée chez la souris (Koodie, Ramakrishnan, and Roy 2010).

Étant donné qu'à la lumière des données existantes, il est difficile de prévoir les effets d'un traitement aussi bien connu que la morphine sur la tumeur osseuse, il devient encore plus important de faire un suivi serré de cette composante de la maladie à l'aide de techniques minimalement invasives comme l'imagerie anatomique et moléculaire.

3. Une nouvelle approche comportementale pour évaluer la douleur spontanée.

La douleur incidente, évoquée par un stimulus extérieur le plus souvent mécanique ou thermique, est la dimension de la douleur la plus étudiée et ce, dans une grande variété de modèles. En effet, la mesure d'un seuil de retrait en réponse à l'application de ce stimulus représente pour les chercheurs la principale (souvent la seule) approche afin d'évaluer le niveau de douleur de l'animal. Or, cette douleur évoquée ne représente en fait qu'une infime minorité de la douleur ressentie par les patients atteints de métastases osseuses (Mercadante and Fulfaro 2007; Mercadante et al. 2002). Les patients cancéreux ressentent plutôt des douleurs lorsqu'ils utilisent le membre affecté dans leurs activités quotidiennes telles que la marche, ou une simple application de poids. La communauté scientifique est d'avis que le faible taux de commercialisation des composés testés en préclinique pour le traitement de la douleur est en partie dû à l'inefficacité des modèles ainsi qu'aux moyens inadéquats utilisés dans l'évaluation des traitements potentiels (Mogil 2009).

Nous avons récemment intégré la distribution pondérale dynamique à notre arsenal comportemental afin de se rapprocher d'une évaluation de la douleur réellement ressentie par l'animal (Tétreault et al. 2011). Cet appareil mesure la répartition du poids de l'animal sur ces points d'appui (les 4 membres ou autres). Dans un contexte de douleur unilatérale, l'animal adopte un comportement d'évitement en diminuant la charge sur le membre affecté. Ce comportement naturel de l'animal, en absence de stimulus extérieur, est un indicateur d'un inconfort qui devrait être renversé par un analgésique efficace.

Dans le but de vérifier cette affirmation, nous avons analysé les effets de différentes drogues disponibles sur le marché pour le traitement de la douleur chronique. Dans un premier temps, nous avons utilisé la morphine puisque cet opioïde représente encore

aujourd'hui l'étalon d'or en douleur cancéreuse. L'évaluation de la morphine dans un modèle animal de cancer osseux pose cependant problème puisqu'il a déjà été démontré que des doses jusqu'à 10 fois plus élevées pouvaient être nécessaires afin de renverser significativement cette douleur (Luger et al. 2002; Saito, Aoe, and Yamamoto 2005; Mouedden and Meert 2007a). Effectivement, la morphine n'a pas démontré d'effet analgésique significatif. Cela est en accord avec d'autres études ayant utilisé la même dose (3 mg/kg) et qui n'avait pas enregistré d'effet anti-allodynique chez la souris (Luger et al. 2002). En plus de la sévérité et du caractère complexe de la douleur cancéreuse, l'hypothèse d'une diminution de l'expression des récepteurs μ -opioïdes dans les ganglions de la racine dorsale pourrait expliquer l'inefficacité de ce composé, pourtant très efficace dans plusieurs syndromes douloureux chroniques (J. Yamamoto et al. 2008). Pourtant, d'autres études chez le rat ont montré un effet analgésique de la morphine dans un modèle similaire (Urch et al. 2005). Les modalités utilisées pour mesurer cet effet étaient cependant assez différentes et il est difficile de tirer des comparaisons avec nos résultats. De plus, les tests étaient réalisés entre les jours 11 et 15, soit plus précocement que dans notre étude. Il est aussi à noter que les protocoles d'administration varient beaucoup dans la littérature, passant d'une administration ponctuelle à une infusion continue en passant par des injections répétées.

Des traitements plus éprouvés en clinique mais moins dans les modèles animaux ont été testés afin de trouver un analgésique qui saurait renverser les modifications de distribution pondérale dans notre modèle. L'antidépresseur tricyclique amytriptilline n'a pas eu non plus d'effet sur la douleur cancéreuse. À dose élevée, ce médicament utilisé fréquemment en douleur neuropathique diminue le temps pendant lequel la souris garde sa patte surélevée (lifting) dans une étude par Mouedden et Meert (Mouedden and Meert 2007a). Par contre, de telles doses ont été abandonnées dans notre modèle car les effets secondaires de sédation et d'inhibition de l'activité locomotrice ont été jugés trop importants. D'ailleurs, aucune mention de tels effets n'a été retrouvée dans cette étude, ce qui laisse supposer que ces effets secondaires étaient présents mais ont été ignorés. De notre côté nous avons estimé que ces effets indésirables diminuaient de façon importante

la fiabilité du test d'allodynie mécanique et que le traitement ne pouvait être convenablement évalué. Des résultats très similaires ont été obtenus avec le tramadol.

Il apparaît donc qu'il est plutôt difficile de démasquer l'effet analgésique des traitements actuels à l'aide du test de distribution pondérale dynamique. Cela peut être dû aux propriétés même de l'appareil (seuil de détection, résolution spatiale et temporelle) mais aussi à notre méthode d'analyse. En effet, cet appareil est relativement nouveau et nous avons participé de façon très active à son développement avec le manufacturier. Ainsi, nous sommes constamment en train d'améliorer et de raffiner nos méthodes d'analyse. Les données présentées dans les figures 14 à 16 sont montrées à titre préliminaire puisqu'il est possible de chercher d'autres manières de présenter les données qui mettent en évidence des différences insoupçonnées jusqu'alors. Les données seront donc ré-analysées dans un futur rapproché afin de prendre en considération le temps d'utilisation, les pourcentages moyens de retour vers les valeurs contrôles, la compensation vers les pattes avant, etc.

Il est à noter qu'aucun test d'hyperalgésie thermique n'est montré dans cette thèse, mais que ce n'est pas faute d'avoir testé cette modalité chez nos animaux. En effet, il n'a pas été possible de mettre en évidence une différence entre le seuil de retrait à la chaleur des animaux cancéreux et celui des animaux sham. Cela est en accord avec la littérature car l'hyperalgésie thermique, malgré son utilisation courante dans les études sur d'autres types de douleur, est un phénomène très marginal en douleur cancéreuse. Seul un groupe de recherche a été en mesure de démontrer une hyperalgésie thermique chez le rat (Zhang et al. 2005 ; Zhang et Lao 2012). Certaines caractéristiques propres à ce modèle telle que la souche cellulaire utilisée (cellules prostatiques AT3.1) pourraient expliquer cette différence. Il n'en demeure pas moins que l'hyperalgésie thermique n'est que très peu documentée en douleur cancéreuse. Il s'agit là d'un autre aspect qui fait que la douleur cancéreuse se démarque des autres types de douleur, du moins chez les rongeurs.

4. Les analogues de la neurotensine pour le traitement de la douleur cancéreuse.

Les agonistes neurotensinergiques que nous avons utilisés pour effectuer nos tests en douleur cancéreuse ont soigneusement été sélectionnés à la lumière des résultats obtenus en douleurs aiguë, tonique ou encore chronique (Sarret et al. 2005; Roussy et al. 2008; Roussy et al. 2009); Données non-publiées). Les composés les plus efficaces au test du retrait de la queue et au test à la formaline ont donc été injectés par voie intrathécale chez nos rats cancéreux. Certains de ces agonistes n'ont pas donné les résultats escomptés en douleur cancéreuse. En effet, ni le NT69L, ni le JMV-2007 n'ont renversé l'allodynie mécanique ou les modifications de la distribution pondérale dans notre modèle. Ces résultats sont tout de même surprenants puisque nous avons de bonnes raisons de croire que le NT69L donnerait de bons résultats. En plus de la validation que nous avons effectué à l'interne pour s'assurer de la dose à utiliser et de l'effet dans d'autres modèles, le groupe de recherche qui a synthétisé cet agoniste avait démontré l'effet de cet agoniste dans plusieurs autres modèles chez la souris (Tyler-McMahon et al. 2000; Boules et al. 2009; K. E. Smith et al. 2012). De plus, cet agoniste pseudo-peptidergique est un de ceux ayant servi à démontrer le potentiel du système neurotensinergique pour le soulagement de la douleur chronique neuropathique (Guillemette et al. 2012). Il est probable que les différences entre la douleur cancéreuse et les autres types de douleur chronique soient à l'origine de l'inefficacité du NT69L dans notre modèle. La douleur cancéreuse comporte des composantes inflammatoires et neuropathiques, mais n'est pas une somme ni une combinaison de ces deux états (Honore and Mantyh 2000). Nous avons donc appris à nos dépens qu'un composé ayant des effets analgésiques dans un modèle inflammatoire (formaline) et dans un modèle neuropathique, pourrait bien perdre cet effet en présence d'une métastase osseuse. Le choix de la dose (voir aussi le site d'injection, le mode d'administration (continue, répétée..) est aussi un paramètre qui pourrait poser problème. En effet, la dose de NT69L utilisée induisait des effets secondaires non-négligeables susceptibles d'influencer la nociception tels que l'hypothermie et une certaine forme de sédation. Le groupe de Richelson et collègues s'avoue d'ailleurs incapable de dissocier l'effet anti-nociceptif du NT69L de son effet hypothermique. Lorsque pour une raison ou pour une autre, l'effet hypothermique était absent, l'analgésie était elle aussi perdue (K. E. Smith et al. 2012). Nous avons donc été forcés de nous limiter à une dose de 5 µg/kg afin de réduire ces effets secondaires alors qu'il aurait probablement fallu l'augmenter pour en

arriver à un effet analgésique intéressant en douleur cancéreuse. Le NT69L pourrait par contre représenter une avenue intéressante s'il est utilisé en combinaison avec d'autres analgésiques. En effet, une récente étude a déterminé que le NT69L et la morphine produisaient un effet synergique en douleur aiguë (Boules et al. 2009). Une dose réduite de NT69L en partenariat avec une faible dose d'opioïde est donc envisageable.

Le JMV-2007 est un agoniste non-sélectif des récepteurs neurotensinergiques liant les deux récepteurs avec une affinité picomolaire. Ce composé s'annonçait prometteur puisqu'une injection dans la médulla rostro-ventrale inhibe complètement la douleur produite par une injection intra-plantaire de formaline (Lafrance M., données non-publiées). Cependant, aucun effet analgésique n'a été observé dans notre modèle. Ce résultat est plutôt étonnant puisqu'on aurait pu s'attendre à ce qu'un agoniste ayant une aussi forte affinité pour NTS1 et NTS2 aurait été très efficace. L'explication de ce résultat réside probablement dans le concept d'agoniste biaisé, qui sera discuté plus loin.

Deux autres agonistes ont été testés dans notre modèle. Le premier est un agoniste spécifique pour le récepteur NTS2. Le JMV-431 a déjà fait ses preuves en douleur aiguë (Sarret et al. 2005; Doré-Savard et al. 2008) et tonique (Roussy et al. 2009). Cet agoniste a également renversé efficacement l'allodynie mécanique au jour 14 dans notre modèle à la dose la plus élevée. Le portrait est semblable pour la distribution pondérale dynamique. En effet, les changements de posture sont renversés au stade plus précoce du développement de la douleur alors que ceux-ci semblent irréversibles aux jours tardifs.

De son côté, le JMV-2009 est un agoniste non-sélectif un peu « moins éprouvé » dans notre laboratoire. Nous menons présentement des études simultanées dans plusieurs modèles de douleur chronique et les résultats convergent vers un effet analgésique intéressant. D'abord, il est à noter que le JMV-2009 ne présente pas les effets secondaires des autres agonistes liant le récepteur NTS1 tels que la NT, le NT69L ou encore le PD149163 (agoniste sélectif NTS1, voir (Roussy et al. 2008; Guillemette et al. 2012)). Il est donc possible d'augmenter la dose d'agoniste administrée de façon importante sans avoir à surveiller ses effets indésirables. Il est aussi particulièrement intéressant de constater son puissant effet

anti-allodynie au jour 14 post-implantation et au jour 18 (stade tardif). Par contre, aucun effet analgésique n'est observé au DWB. Le JMV-431 et le JMV-2009 sont donc des composés ayant un potentiel intéressant pour le soulagement de la douleur cancéreuse. Par contre, le NT69L et le JMV-2007, deux agonistes non-sélectifs ayant une affinité élevée pour NTS1 et NTS2, ne démontrent pas d'efficacité dans notre modèle de douleur cancéreuse.

Le fait le plus surprenant à propos de ces résultats est la différence très marquée entre les effets d'agonistes ayant en apparence des propriétés similaires. Le principal facteur pouvant expliquer ces différences est que ces peptides présentent une sélectivité fonctionnelle. La sélectivité fonctionnelle, ou agonisme biaisé, est la capacité d'un ligand de déclencher certains types de signaux transductionnels dans la cellule plutôt que d'autres ; de favoriser certaines voies de signalisation. De tels mécanismes ont été démontrés dans plusieurs systèmes à récepteurs couplés aux protéines G tels que le système cannabinoïde (Bosier et al. 2010) et le récepteur à l'hormone parathyroïde (Gesty-Palmer and Luttrell 2011). Dans le cas de ce dernier, il est maintenant bien connu que les différents ligands dirigés contre le récepteur PTH₁R peuvent recruter des protéines G différentes et interagir différemment avec les β -Arrestine 1/2 (revue dans (Gesty-Palmer and Luttrell 2011)).

Un tel concept pourrait être aisément reproduit dans le système neurotensinergique. En effet, la liaison au récepteur NTS1 peut déclencher plusieurs voies de signalisation via les différentes protéines G ainsi que la voie β -Arrestine. Par contre, alors que la neurotensine agit comme plein agoniste, son analogue ESAI favorise l'interaction avec Gi et Gs plutôt que Gq (Pelaprat 2006). Ainsi, cet agoniste provoque une production très faible d'inositol triphosphate par rapport à la NT ou au JMV-449, un autre agoniste NTS1. Il est par contre parfaitement capable d'activer les voies de l'AMP cyclique et de l'acide arachidonique. Ces profils de sélectivité fonctionnelle ne sont pas connus pour les agonistes que nous avons utilisés dans notre étude et il est bien possible que le JMV-2007 et le NT69L n'activent pas (ou pas suffisamment) les voies liées au soulagement de la douleur cancéreuse alors que le JMV-2009 puisse activer ses voies. À l'opposé, il semblerait que le JMV-2009 n'activent pas la production des seconds messagers responsables de certains effets secondaires de la NT

tels que l'hypothermie. La possibilité d'exploiter ce genre de sélectivité fonctionnelle soulèverait beaucoup d'intérêt puisque les « bons agonistes » pourraient être utilisés à dose élevée sans que l'on ait à craindre les effets secondaires indésirables. Malheureusement, la spécificité de l'action des différentes voies de signalisation intracellulaire n'est pas du tout connue pour les récepteurs de la NT. Il est aussi peu probable que la fonction des différentes voies soit compartimentée tel qu'on aimerait le voir dans un modèle idéal.

5. Le système neurotensinergique et les cancers métastatiques.

Une des principales raisons pour laquelle nous voulions être en mesure de faire un suivi rapproché de notre modèle en imagerie médicale est que nous voulions être en mesure de détecter tout effet qu'auraient pu avoir nos traitements sur la tumeur ou l'environnement osseux. Cela risque d'être particulièrement important dans le cas d'un traitement systémique visant le système neurotensinergique. En effet, La neurotensine joue un rôle dans la croissance des tissus néoplasiques au niveau de l'intestin, du colon, du sein, du pancréas et de la prostate (Evers 2006; Carraway and Plona 2006). Le récepteur NTS1 est présent dans de nombreuses lignées mammaires cancéreuses mais pas dans les cellules épithéliales mammaires normales (Somaï et al. 2002). La NT inhiberait l'apoptose et augmenterait la prolifération des cellules humaines MCF-7 via la production de Bcl-2. Ainsi, la présence de NTS1 dans les cellules cancéreuses est maintenant considérée comme un facteur aggravant, marqueur d'un grade élevé (Dupouy et al. 2011). Il sera donc d'une importance capitale de surveiller attentivement la progression du cancer lorsque nous aurons en main des traitements pouvant être administrés par voie systémique. Nous ne voulons surtout pas aggraver la maladie en traitant la douleur. Les agonistes du récepteur NTS2 sont moins susceptibles d'induire des effets non-désirés sur la tumeur mais son rôle potentiel en cancer demeure méconnu. Un suivi adéquat sera tout aussi indiqué lorsque nous effectuerons des études avec ces composés.

6. La neurotensine dans l'imagerie médicale diagnostique

Le patron d'expression de la NT dans certains tissus néoplasiques ouvre une porte à l'utilisation d'analogues radio-marqués pour la détection de certains cancers (Fani, Maecke, and Okarvi 2012). Un premier peptide marqué à l'Indium-111 a permis de constater que ce traceur s'accumulait de manière préférentielle dans une tumeur de type colorectale sur une période de 24 heures (de Visser et al. 2003). Un peptide marqué au technétium-99 a aussi permis d'imager une tumeur de type colorectale implantée chez la souris (Maina et al. 2007; García-Garayoa et al. 2009). Le foie et l'intestin causaient beaucoup de captage non-spécifique mais l'intensité du captage était très importante. La possibilité de coupler le peptide avec un isotope du rhénium (^{188}Re) à des fins thérapeutiques a aussi été abordée dans cette étude. Les premiers résultats montrent une diminution de 50% de la croissance de la tumeur. Les études se poursuivent afin de valider cette approche chez l'animal. Pour l'instant, aucune preuve de concept de ce genre n'a été réalisée dans des cas de tumeurs mammaires, mais il est évident que le rôle de la NT dans des métastases osseuses suite à un cancer mammaire ne se limitera pas seulement au traitement de la douleur. Étant donné l'approche d'imagerie médicale que nous avons développée dans notre modèle, un outil tel qu'un analogue neurotensinergique imageable pour la détection et voir même le traitement de la tumeur serait hautement pertinent.

7. Perspectives

L'élaboration d'un nouveau modèle animal demande une caractérisation détaillée. C'est principalement ce qui a été réalisé dans ce projet. Maintenant, il est temps de valider les options thérapeutiques sur lesquelles nous travaillons dans le laboratoire. En premier lieu, deux agonistes neurotensinergiques ont donné des effets analgésiques intéressants. Le JMV-431 et le JMV-2009 seront donc les principaux composés qui seront utilisés dans l'avenir en attendant des analogues disponibles par voie systémique plus puissants et favorisant la voie analgésique (quelle qu'elle soit) par rapport aux voies associées aux effets secondaires. L'administration intrathécale ponctuelle a donné certains résultats, mais il est fort possible qu'une séquence d'administration différente nous permettra

d'atteindre de meilleurs résultats. Une infusion continue intrathécale risque de non seulement soulager la douleur cancéreuse dans l'immédiat, mais aussi de ralentir son évolution.

L'expression de la NT et de ces récepteurs dans le système nerveux a été caractérisée de façon détaillée dans la littérature (Sarret et Beudet 2003). Par contre, les changements au niveau de cette expression en conditions de douleur chronique ne sont pas connus. Des études sont actuellement en cours dans notre laboratoire afin de mieux comprendre les variations dans les niveaux d'expression de la NT et de ces récepteurs dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale. Il sera aussi important d'examiner les variations d'expression protéique dans ces tissus à l'aide d'expérience d'immunohistochimie. Il nous sera alors possible de mieux comprendre les effets de nos traitements et de possiblement ajuster notre stratégie.

La procédure d'imagerie IRM/TEP que nous avons mise au point est toujours en développement. Au moment d'écrire ces lignes, le choix du traceur que nous allons utilisé n'est toujours pas définitif et il est bien possible que nous ne soyons pas au fait de toute les informations que ces images nous fournissent. Nous prévoyons de faire une analyse plus poussée des images que nous avons afin de bien définir les paramètres que nous choisirons pour le suivi de traitement. Par la suite, nous allons valider cette approche de suivi par imagerie en administrant aux animaux des composés déjà éprouvés comme ayant un effet visible sur ces paramètres. Des études seront amorcées sous peu en utilisant le zoledronate. Nous serons alors fixés sur la capacité de la co-registation IRM/TEP de détecter des différences chez les animaux traités et quel sera le traceur le plus approprié en TEP. Il est d'ailleurs probable que le meilleur traceur sera dicté par la drogue utilisée. Le zoledronate est susceptible de modifier de manière importante le captage du ^{18}F -NaF alors qu'un agent chimiothérapique (le paclitaxel par exemple) provoquera plus probablement des changements dans le captage de la ^{11}C -méthionine ou du ^{18}F -FDG.

Comme c'est présentement le cas en clinique pour les médicaments anti-douleur, il est plutôt improbable qu'un traitement basé uniquement sur la neurotensine soit en mesure

de traiter adéquatement la douleur cancéreuse et ce, chez tous les patients. Les voies neurotensinergiques et opioïdes semblent intimement liées. En effet, l'efficacité d'un agoniste NTS2 est modifiée s'il y a eu administration répétée de morphine au préalable (Bredeloux, Costentin, and Dubuc 2006). Par contre, des effets synergiques ont été observés lors de la co-administration de morphine et du NT69L dans le test de la plaque chaude. De la même manière, cette synergie a été observée entre le NT79 (un agoniste sélectif pour le récepteur NTS2) et la morphine en douleur viscérale et au test à la formaline (Boules et al. 2009; Boules et al. 2011). Finalement, il semble exister un lien entre l'analgésie opioïdérique et le récepteur NTS1, puisque lorsque celui-ci est absent chez des souris invalidées, la morphine perd une partie importante de son effet analgésique en douleur tonique (Roussy et al. 2010). Il serait donc hautement pertinent de combiner une administration de différents agonistes neurotensinergiques avec de faibles doses de morphine. Nous espérons ainsi retrouver un effet analgésique important tout en demeurant à des doses qui permettent d'éviter les effets secondaires des deux types de drogues.

Conclusion

Améliorer la pertinence des modèles animaux pourrait être la clé pour la découverte de nouveaux traitements en douleur chronique et en oncologie. Aussi, une diversification des modèles est nécessaire afin de mettre en scène une grande variété de conditions pathologiques. Notre nouveau modèle de cancer des os répond à ce besoin non seulement de par sa nature (site d'injection, modèle cellulaire), mais aussi de l'étendue de la caractérisation effectuée. En plus des méthodes d'histopathologie et de comportement standard, nous avons appliqué une batterie de tests d'imagerie médicale qui nous permettra de scruter la maladie dans tous ses aspects. Nous avons également intégré des outils comportementaux qui appartiennent à la nouvelle génération, qui fait abstraction de la douleur induite par un stimulus extérieur. De cette façon, nous espérons être en mesure de mettre en évidence des approches thérapeutiques nouvelles qui seront aisément transférées au domaine clinique et ce, pour le meilleur bénéfice des patients atteints de cancer métastatique.

Références

- Alifano, Marco, Frédérique Souazé, Sandra Dupouy, Sophie Camilleri-Broët, Mohamad Younes, Sadi-Menad Ahmed-Zaïd, Takashi Takahashi, et al. 2010. "Neurotensin Receptor 1 Determines the Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer.." *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (17) (September 1): 4401–4410. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0659.
- Arvanitis, Constadina, Pavan K Bendapudi, Jeffrey R Tseng, Sanjiv Sam Gambhir, and Dean W Felsher. 2008. "(18)F and (18)FDG PET Imaging of Osteosarcoma to Non-Invasively Monitor in Situ Changes in Cellular Proliferation and Bone Differentiation Upon MYC Inactivation.." *Cancer Biology & Therapy* 7 (12) (December): 1947–1951.
- Avrahami, E, R Tadmor, O Dally, and H Hadar. 1989. "Early MR Demonstration of Spinal Metastases in Patients with Normal Radiographs and CT and Radionuclide Bone Scans.." *Journal of Computer Assisted Tomography* 13 (4) (July): 598–602.
- Baamonde, Ana, Verdad Curto-Reyes, Lucía Juárez, Alvaro Meana, Agustín Hidalgo, and Luis Menéndez. 2007. "Antihyperalgesic Effects Induced by the IL-1 Receptor Antagonist Anakinra and Increased IL-1beta Levels in Inflamed and Osteosarcoma-Bearing Mice.." *Life Sciences* 81 (8) (August 2): 673–682. doi:10.1016/j.lfs.2007.07.003.
- Bäuerle, Tobias, Heidegard Hilbig, Sönke Bartling, Fabian Kiessling, Astrid Kersten, Annette Schmitt-Gräff, Hans-Ulrich Kauczor, Stefan Delorme, and Martin R Berger. 2008. "Bevacizumab Inhibits Breast Cancer-Induced Osteolysis, Surrounding Soft Tissue Metastasis, and Angiogenesis in Rats as Visualized by VCT and MRI." *Neoplasia (New York, NY)* 10 (5) (May 1): 511–520.
- Bäuerle, Tobias, Maximilian Merz, Dorde Komljenovic, Stefan Zwick, and Wolfhard Semmler. 2010. "Drug-Induced Vessel Remodeling in Bone Metastases as Assessed by Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging and Vessel Size Imaging: a Longitudinal in Vivo Study." *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (12) (June 15): 3215–3225. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2932.
- Behbehani, M M, M T Shipley, and J H McLean. 1987. "Effect of Neurotensin on Neurons in the Periaqueductal Gray: an in Vitro Study.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 7 (7) (July): 2035–2040.
- Berger, Frank, Yu-Po Lee, Andreas M Loening, Arion Chatziioannou, Stephen J Freedland, Richard Leahy, Jay R Lieberman, Arie S Belldegrun, Charles L Sawyers, and Sanjiv S Gambhir. 2002. "Whole-Body Skeletal Imaging in Mice Utilizing microPET: Optimization of Reproducibility and Applications in Animal Models of Bone Disease.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 29 (9) (September): 1225–1236.
- Beyer, Thomas, Lutz S Freudenberg, Johannes Czernin, and David W Townsend. 2011. "The Future of Hybrid Imaging-Part 3: PET/MR, Small-Animal Imaging and Beyond.." *Insights Into Imaging* 2 (3) (June): 235–246. doi:10.1007/s13244-011-0085-4.
- Beyreuther, Bettina K, Noëlle Callizot, Michelle D Brot, Rachel Feldman, Steven C Bain, and Thomas Stöhr. 2007. "Antinociceptive Efficacy of Lacosamide in Rat Models for Tumor- and Chemotherapy-Induced Cancer Pain." *European Journal of Pharmacology* 565 (1-3) (June 22): 98–104. doi:10.1016/j.ejphar.2007.02.041.
- Biswas, Swati, Jeffry S Nyman, JoAnn Alvarez, Anwesa Chakrabarti, Austin Ayres, Julie

- Sterling, James Edwards, et al. 2011. "Anti-Transforming Growth Factor SS Antibody Treatment Rescues Bone Loss and Prevents Breast Cancer Metastasis to Bone.." *PloS One* 6 (11): e27090. doi:10.1371/journal.pone.0027090.
- BLAU, M, W NAGLER, and M A BENDER. 1962. "Fluorine-18: a New Isotope for Bone Scanning.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 3 (July): 332-334.
- Bloom, Aaron P, Juan M Jimenez-Andrade, Reid N Taylor, Gabriela Castañeda-Corral, Magdalena J Kaczmarek, Katie T Freeman, Kathleen A Coughlin, Joseph R Ghilardi, Michael A Kuskowski, and Patrick W Mantyh. 2011. "Breast Cancer-Induced Bone Remodeling, Skeletal Pain, and Sprouting of Sensory Nerve Fibers." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 12 (6) (June 1): 698-711. doi:10.1016/j.jpain.2010.12.016.
- Blouin, Stéphane, Michel Félix Baslé, and Daniel Chappard. 2005. "Rat Models of Bone Metastases." *Clinical & Experimental Metastasis* 22 (8): 605-614. doi:10.1007/s10585-006-9002-5.
- Bosier, Barbara, Giulio G Muccioli, Emmanuel Hermans, and Didier M Lambert. 2010. "Functionally Selective Cannabinoid Receptor Signalling: Therapeutic Implications and Opportunities.." *Biochemical Pharmacology* 80 (1) (July 1): 1-12. doi:10.1016/j.bcp.2010.02.013.
- Boules, M, A Shaw, Y Liang, D Barbut, and E Richelson. 2009. "NT69L, a Novel Analgesic, Shows Synergy with Morphine.." *Brain Research* 1294 (October 19): 22-28. doi:10.1016/j.brainres.2009.07.086.
- Boules, Mona, Hannah Johnston, Jessica Tozy, Kristin Smith, Zhimin Li, and Elliott Richelson. 2011. "Analgesic Synergy of Neurotensin Receptor Subtype 2 Agonist NT79 and Morphine.." *Behavioural Pharmacology* 22 (5-6) (September): 573-581. doi:10.1097/FBP.0b013e3283474a3a.
- Bredeloux, Pierre, Jean Costentin, and Isabelle Dubuc. 2006. "Interactions Between NTS2 Neurotensin and Opioid Receptors on Two Nociceptive Responses Assessed on the Hot Plate Test in Mice.." *Behavioural Brain Research* 175 (2) (December 15): 399-407. doi:10.1016/j.bbr.2006.09.016.
- Bristow, A R, A Agrawal, A J Evans, H C Burrell, E J Cornford, J J James, L Hamilton, et al. 2008. "Can Computerised Tomography Replace Bone Scintigraphy in Detecting Bone Metastases From Breast Cancer? a Prospective Study.." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 17 (1) (February): 98-103. doi:10.1016/j.breast.2007.07.042.
- Brown, Jacques P, Caroline Albert, Bassam A Nassar, Jonathan D Adachi, David Cole, K Shawn Davison, Kent C Dooley, et al. 2009. "Bone Turnover Markers in the Management of Postmenopausal Osteoporosis.." *Clinical Biochemistry* 42 (10-11) (July): 929-942. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.04.001.
- Budde, Matthew D, Eric Gold, E Kay Jordan, and Joseph A Frank. 2012. "Differential Microstructure and Physiology of Brain and Bone Metastases in a Rat Breast Cancer Model by Diffusion and Dynamic Contrast Enhanced MRI.." *Clinical & Experimental Metastasis* 29 (1) (January): 51-62. doi:10.1007/s10585-011-9428-2.
- Buhler, A V, J Choi, H K Proudfit, and G F Gebhart. 2005. "Neurotensin Activation of the NTR1 on Spinally-Projecting Serotonergic Neurons in the Rostral Ventromedial Medulla Is Antinociceptive." *Pain* 114 (1-2) (March 1): 285-294. doi:10.1016/j.jpain.2004.12.031.

- Carraway, R, and S E Leeman. 1973. "The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, From Bovine Hypothalami.." *The Journal of Biological Chemistry* 248 (19) (October 10): 6854–6861.
- Carraway, Robert E, and Ann M Plona. 2006. "Involvement of Neurotensin in Cancer Growth: Evidence, Mechanisms and Development of Diagnostic Tools." *Peptides* 27 (10) (October 1): 2445–2460. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.030.
- Chaplan, S R, F W Bach, J W Pogrel, J M Chung, and T L Yaksh. 1994. "Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw.." *Journal of Neuroscience Methods* 53 (1) (July): 55–63.
- Cheng, Caixa, Dorde Komljenovic, Leyun Pan, Antonia Dimitrakopoulou-Strauss, Ludwig Strauss, and Tobias Bäuerle. 2011. "Evaluation of Treatment Response of Cilengitide in an Experimental Model of Breast Cancer Bone Metastasis Using Dynamic PET with 18F-FDG.." *Hellenic Journal of Nuclear Medicine* 14 (1) (January): 15–20.
- Clineschmidt, B V, and J C McGuffin. 1977. "Neurotensin Administered Intracisternally Inhibits Responsiveness of Mice to Noxious Stimuli.." *European Journal of Pharmacology* 46 (4) (December 15): 395–396.
- Clineschmidt, B V, G E Martin, and D F Veber. 1982. "Antinocisponsive Effects of Neurotensin and Neurotensin-Related Peptides.." *Annals of the New York Academy of Sciences* 400: 283–306.
- Clineschmidt, B V, J C McGuffin, and P B Bunting. 1979. "Neurotensin: Antinocisponsive Action in Rodents.." *European Journal of Pharmacology* 54 (1-2) (February 15): 129–139.
- Clohisy, D R, and M L Ramnaraine. 1998. "Osteoclasts Are Required for Bone Tumors to Grow and Destroy Bone." *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 16 (6) (November 1): 660–666. doi:10.1002/jor.1100160606.
- Clohisy, D R, D Palkert, M L Ramnaraine, I Pekurovsky, and M J Oursler. 1996. "Human Breast Cancer Induces Osteoclast Activation and Increases the Number of Osteoclasts at Sites of Tumor Osteolysis." *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 14 (3) (May 1): 396–402. doi:10.1002/jor.1100140309.
- Cobos, Enrique J, Nader Ghasemlou, Dionéia Araldi, David Segal, Kelly Duong, and Clifford J Woolf. 2012. "Inflammation-Induced Decrease in Voluntary Wheel Running in Mice: a Nonreflexive Test for Evaluating Inflammatory Pain and Analgesia.." *Pain* 153 (4) (April): 876–884. doi:10.1016/j.pain.2012.01.016.
- Coleman, R. 2007a. "On the Horizon: Can Bisphosphonates Prevent Bone Metastases?." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 16 Suppl 3 (December 1): S21–7. doi:10.1016/j.breast.2007.10.006.
- Coleman, R E. 1997. "Skeletal Complications of Malignancy.." *Cancer* 80 (8 Suppl) (October 15): 1588–1594.
- Coleman, Robert. 2007b. "Potential Use of Bisphosphonates in the Prevention of Metastases in Early-Stage Breast Cancer." *Clinical Breast Cancer* 7 Suppl 1 (July 1): S29–35.
- Coleman, Robert, Janet Brown, Evangelos Terpos, Allan Lipton, Matthew R Smith, Richard Cook, and Pierre Major. 2008. "Bone Markers and Their Prognostic Value in Metastatic Bone Disease: Clinical Evidence and Future Directions." *Cancer Treatment Reviews* 34 (7) (November 1): 629–639. doi:10.1016/j.ctrv.2008.05.001.
- Cook, Gary J R. 2010. "PET and PET/CT Imaging of Skeletal Metastases.." *Cancer Imaging* :

- the Official Publication of the International Cancer Imaging Society* 10: 1–8.
doi:10.1102/1470-7330.2010.0022.
- Cook, Gary Jr, Chris Parker, Sue Chua, Bernadette Johnson, Anne-Kirsti Aksnes, and Val J Lewington. 2011. "18F-Fluoride PET: Changes in Uptake as a Method to Assess Response in Bone Metastases From Castrate-Resistant Prostate Cancer Patients Treated with 223Ra-Chloride (Alpharadin)." *EJNMMI Research* 1 (1): 4.
doi:10.1186/2191-219X-1-4.
- Costelloe, Colleen M, Eric M Rohren, John E Madewell, Tsuyoshi Hamaoka, Richard L Theriault, Tse-Kuan Yu, Valerae O Lewis, et al. 2009. "Imaging Bone Metastases in Breast Cancer: Techniques and Recommendations for Diagnosis.." *The Lancet Oncology* 10 (6) (June): 606–614. doi:10.1016/S1470-2045(09)70088-9.
- Curto-Reyes, Verdad, Lucía Juárez, Eva García-Pérez, Manuel Florentino Fresno, Agustín Hidalgo, Luis Menéndez, and Ana Baamonde. 2008. "Local Loperamide Inhibits Thermal Hyperalgesia but Not Mechanical Allodynia Induced by Intratibial Inoculation of Melanoma Cells in Mice." *Cellular and Molecular Neurobiology* 28 (7) (November 1): 981–990. doi:10.1007/s10571-008-9272-3.
- Czernin, Johannes, Nagichettiar Satyamurthy, and Christiaan Schiepers. 2010. "Molecular Mechanisms of Bone 18F-NaF Deposition.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 51 (12) (December): 1826–1829.
doi:10.2967/jnumed.110.077933.
- Dass, Crispin R, and Peter F M Choong. 2007. "Zoledronic Acid Inhibits Osteosarcoma Growth in an Orthotopic Model." *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (12 Pt 1) (December 1): 3263–3270. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0546.
- de Visser, M, P J J M Janssen, A Srinivasan, J C Reubi, B Waser, J L Erion, M A Schmidt, E P Krenning, and M de Jong. 2003. "Stabilised 111In-Labelled DTPA- and DOTA-Conjugated Neurotensin Analogues for Imaging and Therapy of Exocrine Pancreatic Cancer.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30 (8) (August): 1134–1139. doi:10.1007/s00259-003-1189-y.
- Deguchi, M, Y Isobe, S Matsukawa, A Yamaguchi, and G Nakagawara. 1998. "Usefulness of Metyrapone Treatment to Suppress Cancer Metastasis Facilitated by Surgical Stress.." *Surgery* 123 (4) (April): 440–449.
- Dellestable, P, F Granel-Brocard, A-C Rat, P Olivier, D Régent, and J-L Schmutz. 2011. "[Impact of Whole Body Magnetic Resonance Imaging (MRI) in the Management of Melanoma Patients, in Comparison with Positron Emission Tomography/Computed Tomography (TEP/CT) and CT].." *Annales De Dermatologie Et De Vénérologie* 138 (5) (May): 377–383. doi:10.1016/j.annder.2011.02.023.
- Dong, Yan, Qi-Liang Mao-Ying, Jia-Wei Chen, Chang-Jiang Yang, Yan-Qing Wang, and Zhi-Ming Tan. 2011. "Involvement of EphB1 Receptor/ephrinB1 Ligand in Bone Cancer Pain.." *Neuroscience Letters* 496 (3) (June 8): 163–167.
doi:10.1016/j.neulet.2011.04.008.
- Donovan-Rodriguez, T, A H Dickenson, and C E Urch. 2004. "Superficial Dorsal Horn Neuronal Responses and the Emergence of Behavioural Hyperalgesia in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain." *Neuroscience Letters* 360 (1-2) (April 22): 29–32.
doi:10.1016/j.neulet.2004.01.048.
- Donovan-Rodriguez, Tansy, Catherine E Urch, and Anthony H Dickenson. 2006. "Evidence of a Role for Descending Serotonergic Facilitation in a Rat Model of Cancer-Induced

- Bone Pain." *Neuroscience Letters* 393 (2-3) (January 30): 237–242.
doi:10.1016/j.neulet.2005.09.073.
- Doré-Savard, Louis, Geneviève Roussy, Marc-André Dansereau, Michael A Collingwood, Kim A Lennox, Scott D Rose, Nicolas Beaudet, Mark A Behlke, and Philippe Sarret. 2008. "Central Delivery of Dicer-Substrate siRNA: a Direct Application for Pain Research.." *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (7) (July): 1331–1339. doi:10.1038/mt.2008.98.
- Doré-Savard, Louis, Valérie Otis, Karine Belleville, Myriam Lemire, Mélanie Archambault, Luc Tremblay, Jean-François Beaudoin, et al. 2010. "Behavioral, Medical Imaging and Histopathological Features of a New Rat Model of Bone Cancer Pain.." *PloS One* 5 (10): e13774. doi:10.1371/journal.pone.0013774.
- Dubuc, I, J Costentin, J P Terranova, M C Barnouin, P Soubrié, G Le Fur, W Rostène, and P Kitabgi. 1994. "The Nonpeptide Neurotensin Antagonist, SR 48692, Used as a Tool to Reveal Putative Neurotensin Receptor Subtypes." *British Journal of Pharmacology* 112 (2) (June 1): 352–354.
- Dubuc, I, P Sarret, C Labbé-Jullié, J M Botto, E Honoré, E Bourdel, J Martinez, et al. 1999. "Identification of the Receptor Subtype Involved in the Analgesic Effect of Neurotensin.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (1) (January 1): 503–510.
- Dubuc, I, S Remande, and J Costentin. 1999. "The Partial Agonist Properties of Levocabastine in Neurotensin-Induced Analgesia.." *European Journal of Pharmacology* 381 (1) (September 17): 9–12.
- Dupouy, Sandra, Najat Mourra, Van Kien Doan, Anne Gompel, Marco Alifano, and Patricia Forgez. 2011. "The Potential Use of the Neurotensin High Affinity Receptor 1 as a Biomarker for Cancer Progression and as a Component of Personalized Medicine in Selective Cancers.." *Biochimie* 93 (9) (September): 1369–1378.
doi:10.1016/j.biochi.2011.04.024.
- Dupouy, Sandra, Véronique Viardot-Foucault, Marco Alifano, Frédérique Souazé, Geneviève Plu-Bureau, Marc Chaouat, Anne Lavaur, et al. 2009. "The Neurotensin Receptor-1 Pathway Contributes to Human Ductal Breast Cancer Progression.." *PloS One* 4 (1): e4223. doi:10.1371/journal.pone.0004223.
- Dutour, Aurélie, Anne-Valérie Decouvlaere, Jacques Monteil, Marie-Eve Duclos, Olivier Roualdes, Raphaël Rousseau, and Perrine Marec-Bérard. 2009. "18F-FDG PET SUVmax Correlates with Osteosarcoma Histologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy: Preclinical Evaluation in an Orthotopic Rat Model.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 50 (9) (September): 1533–1540.
doi:10.2967/jnumed.109.062356.
- Eccles, Suzanne A, and Danny R Welch. 2007. "Metastasis: Recent Discoveries and Novel Treatment Strategies.." *Lancet* 369 (9574) (May 19): 1742–1757. doi:10.1016/S0140-6736(07)60781-8.
- Even-Sapir, Einat, Ur Metser, Eyal Mishani, Gennady Lievshitz, Hedva Lerman, and Ilan Leibovitch. 2006. "The Detection of Bone Metastases in Patients with High-Risk Prostate Cancer: 99mTc-MDP Planar Bone Scintigraphy, Single- and Multi-Field-of-View SPECT, 18F-Fluoride PET, and 18F-Fluoride PET/CT.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 47 (2) (February): 287–297.
- Evers, B Mark. 2006. "Neurotensin and Growth of Normal and Neoplastic Tissues.." *Peptides*

- 27 (10) (October): 2424–2433. doi:10.1016/j.peptides.2006.01.028.
- Fang, F G, J L Moreau, and H L Fields. 1987. "Dose-Dependent Antinociceptive Action of Neurotensin Microinjected Into the Rostroventromedial Medulla of the Rat." *Brain Research* 420 (1) (September 8): 171–174.
- Fani, M, H R Maেকে, and S M Okarvi. 2012. "Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer.." *Theranostics* 2 (5): 481–501. doi:10.7150/thno.4024.
- Fidler, Isaiah J. 2003. *The Pathogenesis of Cancer Metastasis: the "Seed and Soil" Hypothesis Revisited. Nature Reviews. Cancer*. Vol. 3. doi:10.1038/nrc1098.
- Forrest, S M, K W Ng, D M Findlay, V P Michelangeli, S A Livesey, N C Partridge, J D Zajac, and T J Martin. 1985. "Characterization of an Osteoblast-Like Clonal Cell Line Which Responds to Both Parathyroid Hormone and Calcitonin.." *Calcified Tissue International* 37 (1) (January): 51–56.
- Fox, Alyson, Stephen Medhurst, Jean-Philippe Courade, Marcus Glatt, Janet Dawson, Laszlo Urban, Stuart Bevan, and Isabel Gonzalez. 2004. "Anti-Hyperalgesic Activity of the Cox-2 Inhibitor Lumiracoxib in a Model of Bone Cancer Pain in the Rat." *Pain* 107 (1-2): 33–40.
- Furusato, Bungo, Ahmed Mohamed, Mathias Uhlén, and Johng S Rhim. 2010. "CXCR4 and Cancer.." *Pathology International* 60 (7) (July): 497–505. doi:10.1111/j.1440-1827.2010.02548.x.
- Gach, Katarzyna, Anna Wyrębska, Jakub Fichna, and Anna Janecka. 2011. "The Role of Morphine in Regulation of Cancer Cell Growth.." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 384 (3) (September): 221–230. doi:10.1007/s00210-011-0672-4.
- García-Garayoa, Elisa, Peter Bläuenstein, Alain Blanc, Veronique Maes, Dirk Tourwé, and P August Schubiger. 2009. "A Stable Neurotensin-Based Radiopharmaceutical for Targeted Imaging and Therapy of Neurotensin Receptor-Positive Tumours.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36 (1) (January): 37–47. doi:10.1007/s00259-008-0894-y.
- Geis, C, M Graulich, A Wissmann, T Hagenacker, J Thomale, C Sommer, and M Schäfers. 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 (1) (August 11): 463–474. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.022.
- Gesty-Palmer, Diane, and Louis M Luttrell. 2011. "Refining Efficacy: Exploiting Functional Selectivity for Drug Discovery.." *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)* 62: 79–107. doi:10.1016/B978-0-12-385952-5.00009-9.
- Ghanem, N, C Althoefer, T Kelly, C Lohrmann, J Winterer, O Schäfer, T A Bley, E Moser, and M Langer. 2006. "Whole-Body MRI in Comparison to Skeletal Scintigraphy in Detection of Skeletal Metastases in Patients with Solid Tumors.." *In Vivo (Athens, Greece)* 20 (1) (January): 173–182.
- Ghanem, N, M Uhl, I Brink, O Schäfer, T Kelly, E Moser, and M Langer. 2005. "Diagnostic Value of MRI in Comparison to Scintigraphy, PET, MS-CT and PET/CT for the Detection of Metastases of Bone.." *European Journal of Radiology* 55 (1) (July): 41–55. doi:10.1016/j.ejrad.2005.01.016.
- Ghilardi, Joseph R, Heidi Röhrich, Theodore H Lindsay, Molly A Sevcik, Matthew J Schwei, Kazufumi Kubota, Kyle G Halvorson, et al. 2005. "Selective Blockade of the Capsaicin Receptor TRPV1 Attenuates Bone Cancer Pain." *The Journal of Neuroscience : the Official*

- Journal of the Society for Neuroscience* 25 (12) (March 23): 3126–3131.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3815-04.2005.
- Ghilardi, Joseph R, Katie T Freeman, Juan M Jimenez-Andrade, William G Mantyh, Aaron P Bloom, Michael A Kuskowski, and Patrick W Mantyh. 2010. "Administration of a Tropomyosin Receptor Kinase Inhibitor Attenuates Sarcoma-Induced Nerve Sprouting, Neuroma Formation and Bone Cancer Pain." *Molecular Pain* 6: 87. doi:10.1186/1744-8069-6-87.
- Gilchrist, Laura S, David M Cain, Catherine Harding-Rose, Anh N Kov, Gwen Wendelschafer-Crabb, William R Kennedy, and Donald A Simone. 2005. "Re-Organization of P2X3 Receptor Localization on Epidermal Nerve Fibers in a Murine Model of Cancer Pain." *Brain Research* 1044 (2) (May 24): 197–205. doi:10.1016/j.brainres.2005.02.081.
- Gnant, Michael, Marija Balic, Edgar Petru, Wolfgang Raunik, Christian F Singer, Guenther G Steger, Ingeborg M Watzke, and Thomas Brodowicz. 2012. "Treatment of Bone Metastases in Patients with Advanced Breast Cancer." *Breast Care* 7 (2): 92–98. doi:10.1159/000338650.
- Gordon-Williams, Richard M, and Anthony H Dickenson. 2007. "Central Neuronal Mechanisms in Cancer-Induced Bone Pain." *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 1 (1) (April 1): 6–10. doi:10.1097/SPC.0b013e328133f5e9.
- Gosselin, Romain-Daniel, Marc R Suter, Ru-Rong Ji, and Isabelle Decosterd. 2010. "Glial Cells and Chronic Pain.." *The Neuroscientist : a Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 16 (5) (October): 519–531. doi:10.1177/1073858409360822.
- Grant, Frederick D, Frederic H Fahey, Alan B Packard, Royal T Davis, Abass Alavi, and S Ted Treves. 2008. "Skeletal PET with 18F-Fluoride: Applying New Technology to an Old Tracer.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 49 (1) (January): 68–78. doi:10.2967/jnumed.106.037200.
- Griffiths, J R. 1991. "Are Cancer Cells Acidic?." *British Journal of Cancer* 64 (3) (September): 425–427.
- Gu, Xiaoping, FengMei Mei, Yue Liu, Rui Zhang, Juan Zhang, and ZhengLiang Ma. 2011. "Intrathecal Administration of the Cannabinoid 2 Receptor Agonist JWH015 Can Attenuate Cancer Pain and Decrease mRNA Expression of the 2B Subunit of N-Methyl-D-Aspartic Acid.." *Anesthesia and Analgesia* 113 (2) (August): 405–411. doi:10.1213/ANE.0b013e31821d1062.
- Guillemette, A, M A Dansereau, N Beaudet, E Richelson, and P Sarret. 2012. "Intrathecal Administration of NTS1 Agonists Reverses Nociceptive Behaviors in a Rat Model of Neuropathic Pain.." *European Journal of Pain (London, England)* 16 (4) (April): 473–484. doi:10.1016/j.ejpain.2011.07.008.
- Gupta, Kalpna, Smita Kshirsagar, Liming Chang, Robert Schwartz, Ping-Y Law, Doug Yee, and Robert P Hebbel. 2002. "Morphine Stimulates Angiogenesis by Activating Proangiogenic and Survival-Promoting Signaling and Promotes Breast Tumor Growth.." *Cancer Research* 62 (15) (August 1): 4491–4498.
- Hald, Andreas, Ming Ding, Kristoffer Egerod, Rikke R Hansen, Dorte Konradsen, Stine G Jørgensen, Baris Atalay, Arafat Nasser, Ole J Bjerrum, and Anne-Marie Heegaard. 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." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 91 (1) (November 1): 38–46.

doi:10.1016/j.pbb.2008.04.021.

- Hald, Andreas, Rikke R Hansen, Mette W Thomsen, Ming Ding, Peter I Croucher, Orla Gallagher, Frank H Ebetino, Moustapha Kassem, and Anne-Marie Heegaard. 2009. "Cancer-Induced Bone Loss and Associated Pain-Related Behavior Is Reduced by Risedronate but Not Its Phosphonocarboxylate Analog NE-10790." *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer* 125 (5) (September 1): 1177–1185. doi:10.1002/ijc.24436.
- Hald, Andreas, Signe Nedergaard, Rikke R Hansen, Ming Ding, and Anne-Marie Heegaard. 2009. "Differential Activation of Spinal Cord Glial Cells in Murine Models of Neuropathic and Cancer Pain." *European Journal of Pain (London, England)* 13 (2) (February 1): 138–145. doi:10.1016/j.ejpain.2008.03.014.
- Halvorson, Kyle G, Kazufumi Kubota, Molly A Sevcik, Theodore H Lindsay, Julio E Sotillo, Joseph R Ghilardi, Thomas J Rosol, Leila Boustany, David L Shelton, and Patrick W Mantyh. 2005. "A Blocking Antibody to Nerve Growth Factor Attenuates Skeletal Pain Induced by Prostate Tumor Cells Growing in Bone." *Cancer Research* 65 (20) (October 15): 9426–9435. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0826.
- Halvorson, Kyle G, Molly A Sevcik, Joseph R Ghilardi, Lucy J Sullivan, Nathan J Koewler, Frieder Bauss, and Patrick W Mantyh. 2008. "Intravenous Ibandronate Rapidly Reduces Pain, Neurochemical Indices of Central Sensitization, Tumor Burden, and Skeletal Destruction in a Mouse Model of Bone Cancer." *Journal of Pain and Symptom Management* 36 (3) (September 1): 289–303. doi:10.1016/j.jpainsymman.2007.10.005.
- Hamamoto, Darryl T, Subhalakshmi Giridharagopalan, and Donald A Simone. 2007. "Acute and Chronic Administration of the Cannabinoid Receptor Agonist CP 55,940 Attenuates Tumor-Evoked Hyperalgesia." *European Journal of Pharmacology* 558 (1-3) (March 8): 73–87. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.062.
- Hansen, Rikke Rie, Christian K Nielsen, Arafat Nasser, Stine I M Thomsen, Laura F Eghorn, Yen Pham, Cecilia Schulenburg, et al. 2011. "P2X7 Receptor-Deficient Mice Are Susceptible to Bone Cancer Pain.." *Pain* 152 (8) (August): 1766–1776. doi:10.1016/j.pain.2011.03.024.
- Harada, Y. 1975. "Induction of Metastasizing Carcinoma in Rats and Their Biological Characteristics.." *Acta Pathologica Japonica* 25 (4) (July): 451–461.
- Harada, Y. 1976. "Pituitary Role in the Growth of Metastasizing MRMT-1 Mammary Carcinoma in Rats.." *Cancer Research* 36 (1) (January): 18–22.
- Haubold-Reuter, B G, S Duewell, B R Schilcher, B Marincek, and G K von Schulthess. 1993. "The Value of Bone Scintigraphy, Bone Marrow Scintigraphy and Fast Spin-Echo Magnetic Resonance Imaging in Staging of Patients with Malignant Solid Tumours: a Prospective Study.." *European Journal of Nuclear Medicine* 20 (11) (November): 1063–1069.
- Hausmann, Daniel, Susanne Jochum, Jochen Utikal, Richard Christian Hoffmann, Christian Zechmann, Kurt Wolfgang Neff, Sergij Goerdt, Stefan Oswald Schoenberg, and Dietmar Jörg Dinter. 2011. "Comparison of the Diagnostic Accuracy of Whole-Body MRI and Whole-Body CT in Stage III/IV Malignant Melanoma.." *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 9 (3) (March): 212–222. doi:10.1111/j.1610-0387.2011.07614.x.
- Hetzel, Martin, Coskun Arslanemir, Hans-Helmut König, Andreas K Buck, Karin Nüssle, Gerhard Glatting, Andreas Gabelmann, Jürgen Hetzel, Vinzenz Hombach, and Holger

- Schirrmeister. 2003. "F-18 NaF PET for Detection of Bone Metastases in Lung Cancer: Accuracy, Cost-Effectiveness, and Impact on Patient Management.." *Journal of Bone and Mineral Research : the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (12) (December): 2206–2214. doi:10.1359/jbmr.2003.18.12.2206.
- Histed, Stephanie N, Maria L Lindenberg, Esther Mena, Barış Türkbey, Peter L Choyke, and Karen A Kurdziel. 2012. "Review of Functional/Anatomical Imaging in Oncology.." *Nuclear Medicine Communications* 33 (4) (April): 349–361. doi:10.1097/MNM.0b013e32834ec8a5.
- Hoffman, R M. 1985. "Altered Methionine Metabolism and Transmethylation in Cancer.." *Anticancer Research* 5 (1) (January): 1–30.
- Honore, P, and P W Mantyh. 2000. "Bone Cancer Pain: From Mechanism to Model to Therapy." *Pain Medicine (Malden, Mass)* 1 (4) (December 1): 303–309.
- Honore, P, S D Rogers, M J Schwei, J L Salak-Johnson, N M Luger, M C Sabino, D R Clohisy, and P W Mantyh. 2000. "Murine Models of Inflammatory, Neuropathic and Cancer Pain Each Generates a Unique Set of Neurochemical Changes in the Spinal Cord and Sensory Neurons." *Neuroscience* 98 (3): 585–598.
- Honore, Prisca, Prasant Chandran, Gricelda Hernandez, Donna M Gauvin, Joseph P Mikusa, Chengmin Zhong, Shailen K Joshi, et al. 2009. "Repeated Dosing of ABT-102, a Potent and Selective TRPV1 Antagonist, Enhances TRPV1-Mediated Analgesic Activity in Rodents, but Attenuates Antagonist-Induced Hyperthermia." *Pain* 142 (1-2) (March 1): 27–35. doi:10.1016/j.pain.2008.11.004.
- Honoré, P, J Schwei, S D Rogers, J L Salak-Johnson, M P Finke, M L Ramnaraine, D R Clohisy, and P W Mantyh. 2000. "Cellular and Neurochemical Remodeling of the Spinal Cord in Bone Cancer Pain." *Progress in Brain Research* 129: 389–397.
- Houssami, N, and C M Costelloe. 2012. "Imaging Bone Metastases in Breast Cancer: Evidence on Comparative Test Accuracy.." *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23 (4) (April): 834–843. doi:10.1093/annonc/mdr397.
- Hsu, Wellington K, Mandeep S Virk, Brian T Feeley, David B Stout, Arion F Chatziioannou, and Jay R Lieberman. 2008. "Characterization of Osteolytic, Osteoblastic, and Mixed Lesions in a Prostate Cancer Mouse Model Using 18F-FDG and 18F-Fluoride PET/CT.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 49 (3) (March): 414–421. doi:10.2967/jnumed.107.045666.
- Hu, Ji-Hua, Jian-ping Yang, Lei Liu, Cai-Fang Li, Li-na Wang, Fu-Hai Ji, and Hao Cheng. 2012. "Involvement of CX3CR1 in Bone Cancer Pain Through the Activation of Microglia P38 MAPK Pathway in the Spinal Cord.." *Brain Research* 1465 (July 17): 1–9. doi:10.1016/j.brainres.2012.05.020.
- Hu, Zebin, Janhavi Gupta, Zhenwei Zhang, Helen Gerseny, Arthur Berg, Yun Ju Chen, Zhiling Zhang, et al. 2012. "Systemic Delivery of Oncolytic Adenoviruses Targeting Transforming Growth Factor-B Inhibits Established Bone Metastasis in a Prostate Cancer Mouse Model.." *Human Gene Therapy* (June 25). doi:10.1089/hum.2012.040.
- Hylden, J L, and G L Wilcox. 1983. "Antinociceptive Action of Intrathecal Neurotensin in Mice.." *Peptides* 4 (4) (July): 517–520.
- Iagaru, Andrei, Erik Mittra, David W Dick, and Sanjiv Sam Gambhir. 2011. "Prospective Evaluation of (99m)Tc MDP Scintigraphy, (18)F NaF PET/CT, and (18)F FDG PET/CT for Detection of Skeletal Metastases.." *Molecular Imaging and Biology : MIB : the Official*

- Publication of the Academy of Molecular Imaging* (April 9). doi:10.1007/s11307-011-0486-2.
- Inada, T, A Kushida, S Sakamoto, H Taguchi, and K Shingu. 2007. "Intrathecal Betamethasone Pain Relief in Cancer Patients with Vertebral Metastasis: a Pilot Study.." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 51 (4) (April): 490–494. doi:10.1111/j.1399-6576.2007.01272.x.
- Inoue, Kazuhide, Makoto Tsuda, and Hidetoshi Tozaki-Saitoh. 2007. "Modification of Neuropathic Pain Sensation Through Microglial ATP Receptors.." *Purinergic Signalling* 3 (4) (September): 311–316. doi:10.1007/s11302-007-9071-1.
- Isselbacher, K J. 1972. "Increased Uptake of Amino Acids and 2-Deoxy-D-Glucose by Virus-Transformed Cells in Culture.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (3) (March): 585–589.
- Jacobson, A F, and I Fogelman. 1998. "Bone Scanning in Clinical Oncology: Does It Have a Future?." *European Journal of Nuclear Medicine* 25 (9) (September): 1219–1223.
- Jager, P L, W Vaalburg, J Pruim, E G de Vries, K J Langen, and D A Piers. 2001. "Radiolabeled Amino Acids: Basic Aspects and Clinical Applications in Oncology.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 42 (3) (March): 432–445.
- Jimenez-Andrade, Juan M, Aaron P Bloom, James I Stake, William G Mantyh, Reid N Taylor, Katie T Freeman, Joseph R Ghilardi, Michael A Kuskowski, and Patrick W Mantyh. 2010. "Pathological Sprouting of Adult Nociceptors in Chronic Prostate Cancer-Induced Bone Pain." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (44) (November 3): 14649–14656. doi:10.1523/JNEUROSCI.3300-10.2010.
- Jimenez-Andrade, Juan M, Carl D Martin, Nathan J Koewler, Katie T Freeman, Lucy J Sullivan, Kyle G Halvorson, Christina M Barthold, et al. 2007. "Nerve Growth Factor Sequestering Therapy Attenuates Non-Malignant Skeletal Pain Following Fracture." *Pain* 133 (1-3) (December 15): 183–196. doi:10.1016/j.pain.2007.06.016.
- Jimenez-Andrade, Juan Miguel, Joseph R Ghilardi, Gabriela Castañeda-Corral, Michael A Kuskowski, and Patrick W Mantyh. 2011. "Preventive or Late Administration of Anti-NGF Therapy Attenuates Tumor-Induced Nerve Sprouting, Neuroma Formation, and Cancer Pain.." *Pain* 152 (11) (November): 2564–2574. doi:10.1016/j.pain.2011.07.020.
- Jones, B J, and D J Roberts. 1968. "A Rotarod Suitable for Quantitative Measurements of Motor Incoordination in Naive Mice.." *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie* 259 (2): 211.
- Julius, D, and A I Basbaum. 2001. "Molecular Mechanisms of Nociception." *Nature* 413 (6852) (September 13): 203–210. doi:10.1038/35093019.
- Kaan, Timothy K Y, Ping K Yip, Sital Patel, Meirion Davies, Fabien Marchand, Debra A Cockayne, Philip A Nunn, et al. 2010. "Systemic Blockade of P2X3 and P2X2/3 Receptors Attenuates Bone Cancer Pain Behaviour in Rats.." *Brain : a Journal of Neurology* 133 (9) (September): 2549–2564. doi:10.1093/brain/awq194.
- Kalivas, P W, B A Gau, C B Nemeroff, and A J Prange. 1982. "Antinociception After Microinjection of Neurotensin Into the Central Amygdaloid Nucleus of the Rat.." *Brain Research* 243 (2) (July 15): 279–286.
- Kato, Akira, Kazuhisa Minami, Hisanori Ito, Takako Tomii, Mitsunobu Matsumoto, Satoshi Orita, Tsuyoshi Kihara, Minoru Narita, and Tsutomu Suzuki. 2008. "Oxycodone-Induced Analgesic Effects in a Bone Cancer Pain Model in Mice." *Oncology* 74 Suppl 1: 55–60. doi:10.1159/000143220.

- Khasabova, Iryna A, Sergey G Khasabov, Catherine Harding-Rose, Lia G Coicou, Bryan A Seybold, Amy E Lindberg, Christopher D Steevens, Donald A Simone, and Virginia S Seybold. 2008. "A Decrease in Anandamide Signaling Contributes to the Maintenance of Cutaneous Mechanical Hyperalgesia in a Model of Bone Cancer Pain." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (44) (October 29): 11141–11152. doi:10.1523/JNEUROSCI.2847-08.2008.
- King, Tamara, Anna Vardanyan, Lisa Majuta, Ohannes Melemedjian, Ray Nagle, Anne E Cress, Todd W Vanderah, Josephine Lai, and Frank Porreca. 2007. "Morphine Treatment Accelerates Sarcoma-Induced Bone Pain, Bone Loss, and Spontaneous Fracture in a Murine Model of Bone Cancer." *Pain* 132 (1-2) (November 1): 154–168. doi:10.1016/j.pain.2007.06.026.
- Kirou-Mauro, Andrea M, Amanda Hird, Jennifer Wong, Emily Sinclair, Elizabeth A Barnes, May Tsao, Cyril Danjoux, and Edward Chow. 2009. "Has Pain Management in Cancer Patients with Bone Metastases Improved? a Seven-Year Review at an Outpatient Palliative Radiotherapy Clinic." *Journal of Pain and Symptom Management* 37 (1): 77–84. doi:10.1016/j.jpainsymman.2007.12.014.
- Kobayashi, Megumi, Kenta Watanabe, Satoshi Yokoyama, Chiho Matsumoto, Michiko Hirata, Tsukasa Tominari, Masaki Inada, and Chisato Miyaura. 2012. "Capsaicin, a TRPV1 Ligand, Suppresses Bone Resorption by Inhibiting the Prostaglandin E Production of Osteoblasts, and Attenuates the Inflammatory Bone Loss Induced by Lipopolysaccharide.." *ISRN Pharmacology* 2012: 439860. doi:10.5402/2012/439860.
- Kolosov, Anton, Lucia Aurini, Elizabeth D Williams, Ian Cooke, and Colin S Goodchild. 2011. "Intravenous Injection of Leconotide, an Omega Conotoxin: Synergistic Antihyperalgesic Effects with Morphine in a Rat Model of Bone Cancer Pain.." *Pain Medicine (Malden, Mass)* 12 (6) (June): 923–941. doi:10.1111/j.1526-4637.2011.01118.x.
- Koodie, Lisa, Sundaram Ramakrishnan, and Sabita Roy. 2010. "Morphine Suppresses Tumor Angiogenesis Through a HIF-1alpha/p38MAPK Pathway.." *The American Journal of Pathology* 177 (2) (August): 984–997. doi:10.2353/ajpath.2010.090621.
- Krüger, Stefan, Andreas K Buck, Felix M Mottaghy, Ellen Hasenkamp, Sandra Pauls, Christian Schumann, Thomas Wibmer, Tobias Merk, Vinzenz Hombach, and Sven N Reske. 2009. "Detection of Bone Metastases in Patients with Lung Cancer: 99mTc-MDP Planar Bone Scintigraphy, 18F-Fluoride PET or 18F-FDG PET/CT.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36 (11) (November): 1807–1812. doi:10.1007/s00259-009-1181-2.
- Kubota, K, T Matsuzawa, T Fujiwara, T Sato, M Tada, T Ido, and K Ishiwata. 1989. "Differential Diagnosis of AH109A Tumor and Inflammation by Radioscintigraphy with L-[Methyl-11C]Methionine.." *Japanese Journal of Cancer Research : Gann* 80 (8) (August): 778–782.
- Kundra, Vikas, Chuan S Ng, Jingfei Ma, James A Bankson, Roger E Price, Dianna D Cody, Kim-Anh Do, Lin Han, and Nora M Navone. 2007. "In Vivo Imaging of Prostate Cancer Involving Bone in a Mouse Model.." *The Prostate* 67 (1) (January 1): 50–60. doi:10.1002/pros.20494.
- Lafrance, M, G Roussy, K Belleville, H Maeno, N Beaudet, K Wada, and P Sarret. 2010. "Involvement of NTS2 Receptors in Stress-Induced Analgesia.." *Neuroscience* 166 (2) (March 17): 639–652. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.042.

- Lan, Liu Si, Yang Jian Ping, Wang Li Na, Jiang Miao, Qiu Qiao Cheng, Ma Zhen Ni, Liu Lei, et al. 2010. "Down-Regulation of Toll-Like Receptor 4 Gene Expression by Short Interfering RNA Attenuates Bone Cancer Pain in a Rat Model.." *Molecular Pain* 6: 2. doi:10.1186/1744-8069-6-2.
- Langsteger, Werner, Martin Heinisch, and Ignac Fogelman. 2006. "The Role of Fluorodeoxyglucose, 18F-Dihydroxyphenylalanine, 18F-Choline, and 18F-Fluoride in Bone Imaging with Emphasis on Prostate and Breast.." *Seminars in Nuclear Medicine* 36 (1) (January): 73–92. doi:10.1053/j.semnuclmed.2005.09.002.
- Lantero, Aquilino, Mónica Tramullas, Alvaro Díaz, and María A Hurlé. 2012. "Transforming Growth Factor-B in Normal Nociceptive Processing and Pathological Pain Models.." *Molecular Neurobiology* 45 (1) (February): 76–86. doi:10.1007/s12035-011-8221-1.
- Liang, Haixiang, Shen-Ying Ma, Khalid Mohammad, Theresa A Guise, Gary Balian, and Francis H Shen. 2011. "The Reaction of Bone to Tumor Growth From Human Breast Cancer Cells in a Rat Spine Single Metastasis Model.." *Spine* 36 (7) (April 1): 497–504. doi:10.1097/BRS.0b013e3181d8906f.
- Lindholm, Paula, Maria Lapela, Kjell Någren, Pertti Lehtikoinen, Heikki Minn, and Sirkku Jyrkkiö. 2009. "Preliminary Study of Carbon-11 Methionine PET in the Evaluation of Early Response to Therapy in Advanced Breast Cancer.." *Nuclear Medicine Communications* 30 (1) (January): 30–36.
- Lozano-Ondoua, Alysia N, Courtney Wright, Anna Vardanyan, Tamara King, Tally M Largent-Milnes, Mark Nelson, Juan Miguel Jimenez-Andrade, Patrick W Mantyh, and Todd W Vanderah. 2010. "A Cannabinoid 2 Receptor Agonist Attenuates Bone Cancer-Induced Pain and Bone Loss.." *Life Sciences* 86 (17-18) (April 24): 646–653. doi:10.1016/j.lfs.2010.02.014.
- Luger, N M, P Honore, M A Sabino, M J Schwei, S D Rogers, D B Mach, D R Clohisy, and P W Mantyh. 2001. "Osteoprotegerin Diminishes Advanced Bone Cancer Pain." *Cancer Research* 61 (10) (May 15): 4038–4047.
- Luger, Nancy M, Mary Ann C Sabino, Matthew J Schwei, David B Mach, James D Pomonis, Cathy P Keyser, Michael Rathbun, et al. 2002. "Efficacy of Systemic Morphine Suggests a Fundamental Difference in the Mechanisms That Generate Bone Cancer vs Inflammatory Pain." *Pain* 99 (3) (October 1): 397–406.
- Lyseng-Williamson, Katherine A. 2008. "Zoledronic Acid: a Review of Its Use in Breast Cancer.." *Drugs* 68 (18): 2661–2682.
- Mach, D B, S D Rogers, M C Sabino, N M Luger, M J Schwei, J D Pomonis, C P Keyser, et al. 2002. "Origins of Skeletal Pain: Sensory and Sympathetic Innervation of the Mouse Femur." *Neuroscience* 113 (1): 155–166.
- Maina, Theodosia, Anastasia Nikolopoulou, Eleni Stathopoulou, Athanassios S Galanis, Paul Cordopatis, and Berthold A Nock. 2007. "[99mTc]Demotensin 5 and 6 in the NTS1-R-Targeted Imaging of Tumours: Synthesis and Preclinical Results.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 34 (11) (November): 1804–1814. doi:10.1007/s00259-007-0489-z.
- Mantyh, Patrick W, Denis R Clohisy, Martin Koltzenburg, and Steve P Hunt. 2002. "Molecular Mechanisms of Cancer Pain." *Nature Reviews Cancer* 2 (3) (March): 201–209. doi:10.1038/nrc747.
- Mantyh, Patrick W, Martin Koltzenburg, Lorne M Mendell, Leslie Tive, and David L Shelton. 2011. "Antagonism of Nerve Growth Factor-TrkA Signaling and the Relief of Pain.."

- Anesthesiology* 115 (1) (July): 189–204. doi:10.1097/ALN.0b013e31821b1ac5.
- Mantyh, W G, J M Jimenez-Andrade, J I Stake, A P Bloom, M J Kaczmarek, R N Taylor, K T Freeman, J R Ghilardi, M A Kuskowski, and P W Mantyh. 2010. "Blockade of Nerve Sprouting and Neuroma Formation Markedly Attenuates the Development of Late Stage Cancer Pain.." *Neuroscience* 171 (2) (December 1): 588–598. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.056.
- Mao-Ying, Qi-Liang, Jun Zhao, Zhi-Qiang Dong, Jun Wang, Jin Yu, Min-Fen Yan, Yu-Qiu Zhang, Gen-Cheng Wu, and Yan-Qing Wang. 2006. "A Rat Model of Bone Cancer Pain Induced by Intra-Tibia Inoculation of Walker 256 Mammary Gland Carcinoma Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345 (4) (July 14): 1292–1298. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.186.
- Mao-Ying, Qi-Liang, Xiao-Wei Wang, Chang-Jiang Yang, Xiu Li, Wen-Li Mi, Gen-Cheng Wu, and Yan-Qing Wang. 2012. "Robust Spinal Neuroinflammation Mediates Mechanical Allodynia in Walker 256 Induced Bone Cancer Rats.." *Molecular Brain* 5 (1) (May 20): 16. doi:10.1186/1756-6606-5-16.
- Mazella, J, J M Botto, E Guillemare, T Coppola, P Sarret, and J P Vincent. 1996. "Structure, Functional Expression, and Cerebral Localization of the Levocabastine-Sensitive Neurotensin/Neuromedin N Receptor From Mouse Brain." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (18) (September 15): 5613–5620.
- Medhurst, S J, K Walker, M Bowes, B L Kidd, M Glatt, M Muller, M Hattenberger, et al. 2002. "A Rat Model of Bone Cancer Pain." *Pain* 96 (1-2) (March 1): 129–140.
- Menéndez, Luis, Ana Lastra, Alvaro Meana, Agustín Hidalgo, and Ana Baamonde. 2005. "Analgesic Effects of Loperamide in Bone Cancer Pain in Mice." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 81 (1) (May 1): 114–121. doi:10.1016/j.pbb.2005.02.007.
- Menéndez, Luis, Ana Lastra, Manuel F Fresno, Sara Llamas, Alvaro Meana, Agustín Hidalgo, and Ana Baamonde. 2003. "Initial Thermal Heat Hypoalgesia and Delayed Hyperalgesia in a Murine Model of Bone Cancer Pain." *Brain Research* 969 (1-2) (April 18): 102–109.
- Mercadante, S. 1997. "Malignant Bone Pain: Pathophysiology and Treatment." *Pain* 69 (1-2): 1–18.
- Mercadante, Sebastiano, and Fabio Fulfaro. 2007. "Management of Painful Bone Metastases." *Current Opinion in Oncology* 19 (4) (July 1): 308–314. doi:10.1097/CCO.0b013e3281214400.
- Mercadante, Sebastiano, Lukas Radbruch, Augusto Caraceni, Nathan Cherny, Stein Kaasa, Friedemann Nauck, Carla Ripamonti, Franco De Conno, and Steering Committee of the European Association for Palliative Care EAPC Research Network. 2002. "Episodic (Breakthrough) Pain: Consensus Conference of an Expert Working Group of the European Association for Palliative Care." In, 94:832–839.
- Miao, Xue-Rong, Xiao-Fei Gao, Jing-Xiang Wu, Zhi-Jie Lu, Zhang-Xiang Huang, Xiao-Qing Li, Cheng He, and Wei-Feng Yu. 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. doi:10.1186/1471-2407-10-216.
- Miyagawa, T, T Oku, H Uehara, R Desai, B Beattie, J Tjuvajev, and R Blasberg. 1998. "'Facilitated' Amino Acid Transport Is Upregulated in Brain Tumors.." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18 (5) (May): 500–509. doi:10.1097/00004647-199805000-00005.

- Mogil, Jeffrey S. 2009. "Animal Models of Pain: Progress and Challenges.." *Nature Reviews Neuroscience* 10 (4) (April): 283–294. doi:10.1038/nrn2606.
- Moser, E. 1990. "[The Importance of Bone Scintigraphy in the Aftercare of Patients with Malignancies].." *Der Radiologe* 30 (10) (October): 465–471.
- Mouedden, El, Mohammed, and Theo Frans Meert. 2007a. "Pharmacological Evaluation of Opioid and Non-Opioid Analgesics in a Murine Bone Cancer Model of Pain." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 86 (3) (March 1): 458–467. doi:10.1016/j.pbb.2007.01.003.
- Mouedden, El, Mohammed, and Theo Frans Meert. 2007b. "The Impact of the Opioids Fentanyl and Morphine on Nociception and Bone Destruction in a Murine Model of Bone Cancer Pain." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 87 (1) (May 1): 30–40. doi:10.1016/j.pbb.2007.03.017.
- Moynagh, Michael R, Gabrielle C Collieran, Katarina Tavernaraki, Stephen J Eustace, and Eoin C Kavanagh. 2010. "Whole-Body Magnetic Resonance Imaging: Assessment of Skeletal Metastases.." *Seminars in Musculoskeletal Radiology* 14 (1) (March): 22–36. doi:10.1055/s-0030-1248703.
- Murakami, Koichiro, Shigeyuki Morikawa, Shigeyuki Naka, Koichi Demura, Koichiro Sato, Hisanori Shiomi, Yoshimasa Kurumi, Toshiro Inubushi, and Tohru Tani. 2008. "Correlation Between High Field MR Images and Histopathological Findings of Rat Transplanted Cancer Immediately After Partial Microwave Coagulation." *Magnetic Resonance in Medical Sciences : MRMS : an Official Journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine* 7 (3): 105–112.
- Murayama, Chieko, Norihiro Harada, Takeharu Kakiuchi, Dai Fukumoto, Akemi Kamijo, Akira T Kawaguchi, and Hideo Tsukada. 2009. "Evaluation of D-18F-FMT, 18F-FDG, L-11C-MET, and 18F-FLT for Monitoring the Response of Tumors to Radiotherapy in Mice.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 50 (2) (February): 290–295. doi:10.2967/jnumed.108.057091.
- Mustain, W Conan, Piotr G Rychahou, and B Mark Evers. 2011. "The Role of Neurotensin in Physiologic and Pathologic Processes.." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 18 (1) (February): 75–82. doi:10.1097/MED.0b013e3283419052.
- Müller-Horvat, Christian, Peter Radny, Thomas K Eigentler, Jürgen Schäfer, Christina Pfannenbergl, Marius Horger, Sascha Khorchidi, et al. 2006. "Prospective Comparison of the Impact on Treatment Decisions of Whole-Body Magnetic Resonance Imaging and Computed Tomography in Patients with Metastatic Malignant Melanoma.." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 42 (3) (February): 342–350. doi:10.1016/j.ejca.2005.10.008.
- Myers, Rebecca M, James W Shearman, Matthew O Kitching, Antonio Ramos-Montoya, David E Neal, and Steven V Ley. 2009. "Cancer, Chemistry, and the Cell: Molecules That Interact with the Neurotensin Receptors.." *ACS Chemical Biology* 4 (7) (July 17): 503–525. doi:10.1021/cb900038e.
- Nagae, Maho, Toru Hiraga, and Toshiyuki Yoneda. 2007. "Acidic Microenvironment Created by Osteoclasts Causes Bone Pain Associated with Tumor Colonization." *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 25 (2): 99–104. doi:10.1007/s00774-006-0734-8.
- Nemeroff, C B, A J Osbahr, P J Manberg, G N Ervin, and A J Prange. 1979. "Alterations in Nociception and Body Temperature After Intracisternal Administration of Neurotensin, Beta-Endorphin, Other Endogenous Peptides, and Morphine.." *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (10) (October): 5368–5371.
- Niiyama, Y, T Kawamata, J Yamamoto, S Furuse, and A Namiki. 2009. "SB366791, a TRPV1 Antagonist, Potentiates Analgesic Effects of Systemic Morphine in a Murine Model of Bone Cancer Pain.." *British Journal of Anaesthesia* 102 (2) (February): 251–258. doi:10.1093/bja/aen347.
- Northam, Meredith, Rafael O P de Campos, Miguel Ramalho, Vasco Heredia, Carlos A Gonzalez, Rafael M Azevedo, and Richard C Semelka. 2011. "Bone Metastases: Evaluation of Acuity of Lesions Using Dynamic Gadolinium-Chelate Enhancement, Preliminary Results.." *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI* 34 (1) (July): 120–127. doi:10.1002/jmri.22495.
- Otis, V, P Sarret, and L Gendron. 2011. "Spinal Activation of Delta Opioid Receptors Alleviates Cancer-Related Bone Pain.." *Neuroscience* 183 (June 2): 221–229. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.052.
- Ottewell, Penelope D, Hannu Mönkkönen, Mark Jones, Diane V Lefley, Robert E Coleman, and Ingunn Holen. 2008. "Antitumor Effects of Doxorubicin Followed by Zoledronic Acid in a Mouse Model of Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 100 (16) (August 20): 1167–1178. doi:10.1093/jnci/djn240.
- Ottewell, Penelope D, Julia K Woodward, Diane V Lefley, C Alyson Evans, Robert E Coleman, and Ingunn Holen. 2009. "Anticancer Mechanisms of Doxorubicin and Zoledronic Acid in Breast Cancer Tumor Growth in Bone.." *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (10) (October): 2821–2832. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0462.
- Paget, S. 1889. "The Distribution of Secondary Growth in Cancer of Breast.." *Lancet* 1: 571–573.
- Pan, Hai-Li, Yu-Qiu Zhang, and Zhi-Qi Zhao. 2010. "Involvement of Lysophosphatidic Acid in Bone Cancer Pain by Potentiation of TRPV1 via PKC ϵ Pathway in Dorsal Root Ganglion Neurons.." *Molecular Pain* 6: 85. doi:10.1186/1744-8069-6-85.
- Park, Alice. 2012. "Radiation Risk. Why You Should Think Twice Before Getting a CT Scan.." *Time*, June 25.
- Pelaprat, Didier. 2006. "Interactions Between Neurotensin Receptors and G Proteins." *Peptides* 27 (10) (October 1): 2476–2487. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.027.
- Peters, C M, T H Lindsay, J D Pomonis, N M Luger, J R Ghilardi, M A Sevcik, and P W Mantyh. 2004. "Endothelin and the Tumorigenic Component of Bone Cancer Pain.." *Neuroscience* 126 (4): 1043–1052. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.027.
- Peterson, Jeffrey J. 2007. "F-18 FDG-PET for Detection of Osseous Metastatic Disease and Staging, Restaging, and Monitoring Response to Therapy of Musculoskeletal Tumors.." *Seminars in Musculoskeletal Radiology* 11 (3) (September): 246–260. doi:10.1055/s-2008-1038314.
- Phan, Ha T T, Pieter L Jager, John T M Plukker, Bruce H R Wolffenbuttel, Rudi A Dierckx, and Thera P Links. 2008. "Comparison of 11C-Methionine PET and 18F-Fluorodeoxyglucose PET in Differentiated Thyroid Cancer.." *Nuclear Medicine Communications* 29 (8) (August): 711–716. doi:10.1097/MNM.0b013e328301835c.
- Rachner, Tilman D, Shiv K Singh, Michael Schoppet, Peggy Benad, Martin Bornhäuser, Volker Ellenrieder, Regina Ebert, Franz Jakob, and Lorenz C Hofbauer. 2010. "Zoledronic Acid Induces Apoptosis and Changes the TRAIL/OPG Ratio in Breast Cancer Cells." *Cancer Letters* 287 (1) (January): 109–116. doi:10.1016/j.canlet.2009.06.003.

- Remaury, Anne, Natalio Vita, Sylvain Gendreau, Mireille Jung, Michelle Arnone, Martine Poncelet, Jean-Michel Culouscou, et al. 2002. "Targeted Inactivation of the Neurotensin Type 1 Receptor Reveals Its Role in Body Temperature Control and Feeding Behavior but Not in Analgesia." *Brain Research* 953 (1-2) (October 25): 63–72.
- Roodman, G David. 2004. "Mechanisms of Bone Metastasis." *The New England Journal of Medicine* 350 (16) (April 15): 1655–1664. doi:10.1056/NEJMra030831.
- Roudier, Martine P, Steven D Bain, and William C Dougall. 2006. "Effects of the RANKL Inhibitor, Osteoprotegerin, on the Pain and Histopathology of Bone Cancer in Rats.." *Clinical & Experimental Metastasis* 23 (3-4): 167–175. doi:10.1007/s10585-006-9026-x.
- Roussy, G, H Beaudry, M Lafrance, K Belleville, N Beaudet, K Wada, L Gendron, and P Sarret. 2010. "Altered Morphine-Induced Analgesia in Neurotensin Type 1 Receptor Null Mice.." *Neuroscience* 170 (4) (November 10): 1286–1294. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.016.
- Roussy, Geneviève, Marc-André Dansereau, Louis Doré-Savard, Karine Belleville, Nicolas Beaudet, Elliott Richelson, and Philippe Sarret. 2008. "Spinal NTS1 Receptors Regulate Nociceptive Signaling in a Rat Formalin Tonic Pain Model.." *Journal of Neurochemistry* 105 (4) (May): 1100–1114. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05205.x.
- Roussy, Geneviève, Marc-André Dansereau, Stéphanie Baudisson, Faouzi Ezzoubaa, Karine Belleville, Nicolas Beaudet, Jean Martinez, Elliott Richelson, and Philippe Sarret. 2009. "Evidence for a Role of NTS2 Receptors in the Modulation of Tonic Pain Sensitivity." *Molecular Pain* 5: 38. doi:10.1186/1744-8069-5-38.
- Rozel, Stefan, Craig J Galbán, Klaas Nicolay, Kuei C Lee, Sudha Sud, Chris Neeley, Linda A Snyder, et al. 2009. "Synergy Between Anti-CCL2 and Docetaxel as Determined by DW-MRI in a Metastatic Bone Cancer Model." *Journal of Cellular Biochemistry* 107 (1) (May 1): 58–64. doi:10.1002/jcb.22056.
- Sabino, Mary Ann C, Joseph R Ghilardi, Joost L M Jongen, Cathy P Keyser, Nancy M Luger, David B Mach, Christopher M Peters, et al. 2002. "Simultaneous Reduction in Cancer Pain, Bone Destruction, and Tumor Growth by Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2." *Cancer Research* 62 (24) (December 15): 7343–7349.
- Sabino, Mary Ann C, Nancy M Luger, David B Mach, Scott D Rogers, Matthew J Schwei, and Patrick W Mantyh. 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." *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer* 104 (5) (May 1): 550–558. doi:10.1002/ijc.10999.
- Saito, Osamu, Tomohiko Aoe, and Tatsuo Yamamoto. 2005. "Analgesic Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Acetaminophen, and Morphine in a Mouse Model of Bone Cancer Pain.." *Journal of Anesthesia* 19 (3): 218–224. doi:10.1007/s00540-005-0323-3.
- Salamanna, Francesca, Lucia Martini, Stefania Pagani, Annapaola Parrilli, Gianluca Giavaresi, Maria Cristina Maltarello, and Milena Fini. 2012. "MRMT-1 Rat Breast Carcinoma Cells and Models of Bone Metastases: Improvement of an in Vitro System to Mimic the in Vivo Condition.." *Acta Histochemica* (June 6). doi:10.1016/j.acthis.2012.05.005.
- Sandu, Nora, Gabriele Pöpperl, Marie-Elisabeth Toubert, Toma Spiriev, Belachew Arasho, Mikael Orabi, and Bernhard Schaller. 2011. "Current Molecular Imaging of Spinal Tumors in Clinical Practice.." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 17 (3-4) (March):

- 308–316. doi:10.2119/molmed.2010.00218.
- Sarret, Philippe, Michael J Esdaile, Amélie Perron, Jean Martinez, Thomas Stroh, and Alain Beaudet. 2005. "Potent Spinal Analgesia Elicited Through Stimulation of NTS2 Neurotensin Receptors." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (36) (September 7): 8188–8196. doi:10.1523/JNEUROSCI.0810-05.2005.
- Sasamura, Takashi, Shigenobu Nakamura, Yuko Iida, Hideki Fujii, Jun Murata, Ikuo Saiki, Hiroshi Nojima, and Yasushi Kuraishi. 2002. "Morphine Analgesia Suppresses Tumor Growth and Metastasis in a Mouse Model of Cancer Pain Produced by Orthotopic Tumor Inoculation." *European Journal of Pharmacology* 441 (3) (April 26): 185–191.
- Sauter, Alexander W, Hans F Wehrl, Armin Kolb, Martin S Judenhofer, and Bernd J Pichler. 2010. "Combined PET/MRI: One Step Further in Multimodality Imaging." *Trends in Molecular Medicine* 16 (11) (November): 508–515. doi:10.1016/j.molmed.2010.08.003.
- Schwei, M J, P Honore, S D Rogers, J L Salak-Johnson, M P Finke, M L Ramnaraine, D R Clohisy, and P W Mantyh. 1999. "Neurochemical and Cellular Reorganization of the Spinal Cord in a Murine Model of Bone Cancer Pain." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (24) (December 15): 10886–10897.
- Schwenzer, N F, L Stegger, S Bisdas, C Schraml, A Kolb, A Boss, M Muller, et al. 2012. "Simultaneous PET/MR Imaging in a Human Brain PET/MR System in 50 Patients-Current State of Image Quality." *European Journal of Radiology* (January 17). doi:10.1016/j.ejrad.2011.12.027.
- Schwenzer, Nina F, Christina Schraml, Mark Müller, Cornelia Brendle, Alexander Sauter, Werner Spengler, Anna C Pfannenbergl, Claus D Claussen, and Holger Schmidt. 2012. "Pulmonary Lesion Assessment: Comparison of Whole-Body Hybrid MR/PET and PET/CT Imaging--Pilot Study." *Radiology* (May 31). doi:10.1148/radiol.12111942.
- Seong, Jinsil, Hee Chul Park, Jiyoung Kim, Un Jung Kim, and Bae Whan Lee. 2004. "Radiation-Induced Alteration of Pain-Related Signals in an Animal Model with Bone Invasion From Cancer." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030 (December): 179–186. doi:10.1196/annals.1329.023.
- Sevcik, Molly A, Joseph R Ghilardi, Christopher M Peters, Theodore H Lindsay, Kyle G Halvorson, Beth M Jonas, Kazufumi Kubota, et al. 2005. "Anti-NGF Therapy Profoundly Reduces Bone Cancer Pain and the Accompanying Increase in Markers of Peripheral and Central Sensitization." *Pain* 115 (1-2) (May 1): 128–141. doi:10.1016/j.pain.2005.02.022.
- Sevcik, Molly A, Joseph R Ghilardi, Kyle G Halvorson, Theodore H Lindsay, Kazufumi Kubota, and Patrick W Mantyh. 2005. "Analgesic Efficacy of Bradykinin B1 Antagonists in a Murine Bone Cancer Pain Model." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 6 (11) (November 1): 771–775. doi:10.1016/j.jpain.2005.06.010.
- Sevcik, Molly A, Nancy M Luger, David B Mach, Mary Ann C Sabino, Christopher M Peters, Joseph R Ghilardi, Matthew J Schwei, et al. 2004. "Bone Cancer Pain: the Effects of the Bisphosphonate Alendronate on Pain, Skeletal Remodeling, Tumor Growth and Tumor Necrosis." *Pain* 111 (1-2) (September 1): 169–180. doi:10.1016/j.pain.2004.06.015.
- Siegel, Rebecca, Carol Desantis, Katherine Virgo, Kevin Stein, Angela Mariotto, Tenbroeck Smith, Dexter Cooper, et al. 2012. "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2012." *CA: a Cancer Journal for Clinicians* (June 14). doi:10.3322/caac.21149.
- Siegel, Rebecca, Deepa Naishadham, and Ahmedin Jemal. 2012. "Cancer Statistics, 2012."

- CA: a Cancer Journal for Clinicians* 62 (1) (January): 10–29. doi:10.3322/caac.20138.
- Simon, R H, and T E Arbo. 1986. "Morphine Increases Metastatic Tumor Growth.." *Brain Research Bulletin* 16 (3) (March): 363–367.
- Singhal, Tarun, Tanjore K Narayanan, Viney Jain, Jogeshwar Mukherjee, and Joseph Mantil. 2008. "11C-L-Methionine Positron Emission Tomography in the Clinical Management of Cerebral Gliomas.." *Molecular Imaging and Biology : MIB : the Official Publication of the Academy of Molecular Imaging* 10 (1) (January): 1–18. doi:10.1007/s11307-007-0115-2.
- Smith, D J, A A Hawranko, P J Monroe, D Gully, M O Urban, C R Craig, J P Smith, and D L Smith. 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.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282 (2) (August): 899–908.
- Smith, Kristin E, Mona Boules, Katrina Williams, and Elliott Richelson. 2012. "NTS1 and NTS2 Mediate Analgesia Following Neurotensin Analog Treatment in a Mouse Model for Visceral Pain.." *Behavioural Brain Research* 232 (1) (June 15): 93–97. doi:10.1016/j.bbr.2012.03.044.
- Somai, Sonia, Anne Gompel, William Rostène, and Patricia Forgez. 2002. "Neurotensin Counteracts Apoptosis in Breast Cancer Cells.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (2) (July 12): 482–488.
- Sukhtankar, Devki, Alec Okun, Anupama Chandramouli, Mark A Nelson, Todd W Vanderah, Anne E Cress, Frank Porreca, and Tamara King. 2011. "Inhibition of P38-MAPK Signaling Pathway Attenuates Breast Cancer Induced Bone Pain and Disease Progression in a Murine Model of Cancer-Induced Bone Pain.." *Molecular Pain* 7: 81. doi:10.1186/1744-8069-7-81.
- Svensson, Camilla I, Satyanarayana Medicherla, Shelle Malkmus, Yebin Jiang, Jing Y Ma, Irena Kerr, Josue Brainin-Mattos, et al. 2008. "Role of P38 Mitogen Activated Protein Kinase in a Model of Osteosarcoma-Induced Pain." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 90 (4) (October 1): 664–675. doi:10.1016/j.pbb.2008.05.016.
- Takekoshi, T, K Sakata, T Kunieda, S Saji, H Tanemura, and S Yamamoto. 1984. "Facilitation of Tumor Metastasis by Operative Stress and Participation of Cell-Mediated Immunity. Experimental Study.." *Oncology* 41 (4): 245–251.
- Tanaka, K, M Masu, and S Nakanishi. 1990. "Structure and Functional Expression of the Cloned Rat Neurotensin Receptor.." *Neuron* 4 (6) (June): 847–854.
- Tanemura, H, K Sakata, T Kunieda, S Saji, S Yamamoto, and T Takekoshi. 1982. "Influences of Operative Stress on Cell-Mediated Immunity and on Tumor Metastasis and Their Prevention by Nonspecific Immunotherapy: Experimental Studies in Rats.." *Journal of Surgical Oncology* 21 (3) (November): 189–195.
- Tateishi, Ukihide, Satoshi Morita, Masataka Taguri, Kazuya Shizukuishi, Ryogo Minamimoto, Masashi Kawaguchi, Takeshi Murano, Takashi Terauchi, Tomio Inoue, and E Edmund Kim. 2010. "A Meta-Analysis of (18)F-Fluoride Positron Emission Tomography for Assessment of Metastatic Bone Tumor.." *Annals of Nuclear Medicine* 24 (7) (August): 523–531. doi:10.1007/s12149-010-0393-7.
- Temma, Takashi, Kohei Sano, Yuji Kuge, Junko Kamihashi, Nozomi Takai, Yuki Ogawa, and Hideo Saji. 2009. "Development of a Radiolabeled Probe for Detecting Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase on Malignant Tumors.." *Biological & Pharmaceutical*

Bulletin 32 (7) (July): 1272–1277.

- Tétreault, Pascal, Marc-André Dansereau, Louis Doré-Savard, Nicolas Beaudet, and Philippe Sarret. 2011. "Weight Bearing Evaluation in Inflammatory, Neuropathic and Cancer Chronic Pain in Freely Moving Rats.." *Physiology & Behavior* 104 (3) (September 1): 495–502. doi:10.1016/j.physbeh.2011.05.015.
- Türkbey, Barış, David Thomasson, Yuxi Pang, Marcelino Bernardo, and Peter L Choyke. 2010. "The Role of Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Cancer Diagnosis and Treatment.." *Diagnostic and Interventional Radiology (Ankara, Turkey)* 16 (3) (September): 186–192. doi:10.4261/1305-3825.DIR.2537-08.1.
- Tyler-McMahon, B M, J A Stewart, F Farinas, D J McCormick, and E Richelson. 2000. "Highly Potent Neurotensin Analog That Causes Hypothermia and Antinociception." *European Journal of Pharmacology* 390 (1-2) (February 25): 107–111.
- Tyler-McMahon, B M, M Boules, and E Richelson. 2000. "Neurotensin: Peptide for the Next Millennium.." *Regulatory Peptides* 93 (1-3) (September 25): 125–136.
- Uhl, G R, M J Kuhar, and S H Snyder. 1977. "Neurotensin: Immunohistochemical Localization in Rat Central Nervous System.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (9) (September): 4059–4063.
- Urban, M O, and D J Smith. 1993. "Role of Neurotensin in the Nucleus Raphe Magnus in Opioid-Induced Antinociception From the Periaqueductal Gray.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265 (2) (May): 580–586.
- Urch, C E, T Donovan-Rodriguez, and A H Dickenson. 2003. "Alterations in Dorsal Horn Neurones in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain." *Pain* 106 (3) (December 1): 347–356.
- Urch, Catherine E, Tansy Donovan-Rodriguez, Richard Gordon-Williams, Lucy A Bee, and Anthony H Dickenson. 2005. "Efficacy of Chronic Morphine in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain: Behavior and in Dorsal Horn Pathophysiology." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 6 (12) (December 1): 837–845. doi:10.1016/j.jpain.2005.08.005.
- Vassiliou, V, D Andreopoulos, S Frangos, N Tselis, E Giannopoulou, and S Lutz. 2011. "Bone Metastases: Assessment of Therapeutic Response Through Radiological and Nuclear Medicine Imaging Modalities.." *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 23 (9) (November): 632–645. doi:10.1016/j.clon.2011.03.010.
- Vincent, J P. 1992. "Neurotensin Receptors. Binding Properties, Transduction Mechanisms, and Purification.." *Annals of the New York Academy of Sciences* 668: 90–100.
- Vincent, J P, J Mazella, and P Kitabgi. 1999. "Neurotensin and Neurotensin Receptors." *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (7) (July 1): 302–309.
- Virk, Mandeep S, Frank A Petrigliano, Nancy Q Liu, Arion F Chatziioannou, David Stout, Christine O Kang, William C Dougall, and Jay R Lieberman. 2009. "Influence of Simultaneous Targeting of the Bone Morphogenetic Protein Pathway and RANK/RANKL Axis in Osteolytic Prostate Cancer Lesion in Bone.." *Bone* 44 (1) (January): 160–167. doi:10.1016/j.bone.2008.09.009.
- Wacnik, P W, L J Eikmeier, T R Ruggles, M L Ramnaraine, B K Walcheck, A J Beitz, and G L Wilcox. 2001. "Functional Interactions Between Tumor and Peripheral Nerve: Morphology, Algogen Identification, and Behavioral Characterization of a New Murine Model of Cancer Pain." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (23) (December 1): 9355–9366.

- Walker, Katharine, Stephen J Medhurst, Bruce L Kidd, Markus Glatt, Mick Bowes, Sadhana Patel, Kara McNair, et al. 2002. "Disease Modifying and Anti-Nociceptive Effects of the Bisphosphonate, Zoledronic Acid in a Model of Bone Cancer Pain." *Pain* 100 (3) (December 1): 219–229.
- Wang, Li-na, Jian-ping Yang, Ying Zhan, Fu-Hai Ji, Xiu-Yun Wang, Jian-Ling Zuo, and Qi-nian Xu. 2012. "Minocycline-Induced Reduction of Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Relation to Cancer-Induced Bone Pain in Rats.." *Journal of Neuroscience Research* 90 (3) (March): 672–681. doi:10.1002/jnr.22788.
- Watson, Judy J, Shelley J Allen, and David Dawbarn. 2008. "Targeting Nerve Growth Factor in Pain: What Is the Therapeutic Potential?." *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 22 (6): 349–359.
- Wehrl, Hans F, Martin S Judenhofer, Stefan Wiehr, and Bernd J Pichler. 2009. "Pre-Clinical PET/MR: Technological Advances and New Perspectives in Biomedical Research.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36 Suppl 1 (March): S56–68. doi:10.1007/s00259-009-1078-0.
- Winkelmann, Christopher T, Said Daibes Figueroa, Tammy L Rold, Wynn A Volkert, and Timothy J Hoffman. 2006. "Microimaging Characterization of a B16-F10 Melanoma Metastasis Mouse Model.." *Molecular Imaging* 5 (2) (March): 105–114.
- Wu, J X, M Y Xu, X R Miao, Z J Lu, X M Yuan, X Q Li, and W F Yu. 2012. "Functional Up-Regulation of P2X3 Receptors in Dorsal Root Ganglion in a Rat Model of Bone Cancer Pain.." *European Journal of Pain (London, England)* (April 24). doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00149.x.
- Wu, Lian-Ming, Hai-Yan Gu, Jasmine Zheng, Xiao Xu, Lin-Hua Lin, Xia Deng, Wei Zhang, and Jian-Rong Xu. 2011. "Diagnostic Value of Whole-Body Magnetic Resonance Imaging for Bone Metastases: a Systematic Review and Meta-Analysis.." *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI* 34 (1) (July): 128–135. doi:10.1002/jmri.22608.
- Wu, Lian-Ming, Jian-Rong Xu, Man-Ju Liu, Xiao-Fei Zhang, Jia Hua, Jasmine Zheng, and Jia-Ni Hu. 2012. "Value of Magnetic Resonance Imaging for Nodal Staging in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-Analysis.." *Academic Radiology* 19 (3) (March): 331–340. doi:10.1016/j.acra.2011.10.027.
- Yamamoto, J, T Kawamata, Y Niiyama, K Omote, and A Namiki. 2008. "Down-Regulation of Mu Opioid Receptor Expression Within Distinct Subpopulations of Dorsal Root Ganglion Neurons in a Murine Model of Bone Cancer Pain.." *Neuroscience* 151 (3) (February 6): 843–853. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.11.025.
- Yang, Hui-Lin, Tao Liu, Xi-Ming Wang, Yong Xu, and Sheng-Ming Deng. 2011. "Diagnosis of Bone Metastases: a Meta-Analysis Comparing ¹⁸FDG PET, CT, MRI and Bone Scintigraphy.." *European Radiology* 21 (12) (December): 2604–2617. doi:10.1007/s00330-011-2221-4.
- Yao, Ming, Xiang-yang Chang, Yu-xia Chu, Jian-ping Yang, Li-na Wang, Hao-qiang Cao, Ming-juan Liu, and Qi-nian Xu. 2011. "Antiallodynic Effects of Propentofylline Elicited by Interrupting Spinal Glial Function in a Rat Model of Bone Cancer Pain.." *Journal of Neuroscience Research* 89 (11) (November): 1877–1886. doi:10.1002/jnr.22711.
- Yeager, M P, and T A Colacchio. 1991. "Effect of Morphine on Growth of Metastatic Colon Cancer in Vivo.." *Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 126 (4) (April): 454–456.
- Yin, Qin, Wei Cheng, Ming-Yue Cheng, Su-Zhen Fan, and Wen Shen. 2010. "Intrathecal Injection of Anti-CX3CR1 Neutralizing Antibody Delayed and Attenuated Pain

- Facilitation in Rat Tibial Bone Cancer Pain Model.." *Behavioural Pharmacology* 21 (7) (October): 595–601. doi:10.1097/FBP.0b013e32833e7e2a.
- Yoneda, Toshiyuki, Kenji Hata, Masako Nakanishi, Maho Nagae, Tomotaka Nagayama, Hiroki Wakabayashi, Toshihiko Nishisho, Teruhisa Sakurai, and Toru Hiraga. 2011. "Involvement of Acidic Microenvironment in the Pathophysiology of Cancer-Associated Bone Pain." *Bone* 48 (1): 100–105. doi:10.1016/j.bone.2010.07.009.
- Zhang, R-X, B Liu, A Li, L Wang, K Ren, J-T Qiao, B M Berman, and L Lao. 2008. "Interleukin 1beta Facilitates Bone Cancer Pain in Rats by Enhancing NMDA Receptor NR-1 Subunit Phosphorylation.." *Neuroscience* 154 (4) (July 17): 1533–1538. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.04.072.
- Zhang, Rui-Xin, Aihui Li, Bing Liu, Linbo Wang, Ke Ren, Jian-Tian Qiao, Brian M Berman, and Lixing Lao. 2007. "Electroacupuncture Attenuates Bone Cancer Pain and Inhibits Spinal Interleukin-1 Beta Expression in a Rat Model." *Anesthesia and Analgesia* 105 (5) (November 1): 1482–8, table of contents. doi:10.1213/01.ane.0000284705.34629.c5.
- Zhang, Rui-Xin, Bing Liu, Linbo Wang, Ke Ren, Jian-Tian Qiao, Brian M Berman, and Lixing Lao. 2005. "Spinal Glial Activation in a New Rat Model of Bone Cancer Pain Produced by Prostate Cancer Cell Inoculation of the Tibia." *Pain* 118 (1-2) (November 1): 125–136. doi:10.1016/j.pain.2005.08.001.
- Zhang, Z, Z Hu, J Gupta, J D Krimmel, H M Gerseny, A F Berg, J S Robbins, H Du, B Prabhakar, and P Seth. 2012. "Intravenous Administration of Adenoviruses Targeting Transforming Growth Factor Beta Signaling Inhibits Established Bone Metastases in 4T1 Mouse Mammary Tumor Model in an Immunocompetent Syngeneic Host.." *Cancer Gene Therapy* (June 29). doi:10.1038/cgt.2012.41.
- Zhao, Dezheng, and Charalabos Pothoulakis. 2006. "Effects of NT on Gastrointestinal Motility and Secretion, and Role in Intestinal Inflammation.." *Peptides* 27 (10) (October): 2434–2444. doi:10.1016/j.peptides.2005.12.016.
- Zhao, Songji, Yuji Kuge, Masashi Kohanawa, Toshiyuki Takahashi, Yan Zhao, Min Yi, Kakuko Kanegae, Koh-Ichi Seki, and Nagara Tamaki. 2008. "Usefulness of 11C-Methionine for Differentiating Tumors From Granulomas in Experimental Rat Models: a Comparison with 18F-FDG and 18F-FLT.." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 49 (1) (January): 135–141. doi:10.2967/jnumed.107.044578.
- Zhao, Songji, Yuji Kuge, Min Yi, Yan Zhao, Toshiyuki Hatano, Keiichi Magota, Ken-ichi Nishijima, Masashi Kohanawa, and Nagara Tamaki. 2011. "Dynamic 11C-Methionine PET Analysis Has an Additional Value for Differentiating Malignant Tumors From Granulomas: an Experimental Study Using Small Animal PET.." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38 (10) (October): 1876–1886. doi:10.1007/s00259-011-1865-2.
- Zwolak, Pawel, Piotr Jasinski, Kaoru Terai, Nathan J Gallus, Marna E Ericson, Denis R Clohisy, and Arkadiusz Z Dudek. 2008. "Addition of Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor to Radiation Increases Tumour Control in an Orthotopic Murine Model of Breast Cancer Metastasis in Bone." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 44 (16) (November 1): 2506–2517. doi:10.1016/j.ejca.2008.07.011.

Remerciements

Les études graduées sont un long parcours. Ce parcours se fait à la fois en solitaire et avec l'aide d'un nombre surprenant de collègues, collaborateurs et mentors. Chacune de ces personnes a fait en sorte que j'ai pu réaliser mes nombreux projets en recherche. Ils m'ont mis sur les bonnes pistes, donné de bons conseils, prodigué des encouragements appréciés et nécessaires. Les quelques paragraphes suivants rendent hommage à ces personnes.

J'aimerais tout d'abord remercier le Pr Philippe Sarret. Philippe a été un excellent superviseur. Il m'a d'abord donné la chance d'effectuer un projet passionnant. Il est un mentor attentionné et disponible, que ce soit pour les choses du laboratoire ou encore celles de la vie de tous les jours. Je le remercie également pour m'avoir encadré avec une certaine rigidité, tout en me donnant la latitude de prendre mes propres décisions. Quand on converse avec Philippe, on a l'impression que notre opinion est aussi importante que la sienne. C'est le genre d'attitude qui donne confiance à l'étudiant et qui le rend meilleur. Je suis aussi reconnaissant pour toutes les fois où je l'ai trouvé un peu trop exigeant. Cela nous a permis à tous dans le laboratoire de rehausser nos standards et ce qui semblait au début un excès de perfectionnisme est devenu la routine, que ce soit pour les posters, les articles, les bourses ou tout simplement une diapo dans une rencontre hebdomadaire. J'atteste donc que Philippe a fait de moi un meilleur scientifique et une meilleure personne. Je lui en serai reconnaissant pour le reste de ma carrière et j'espère que je pourrai l'y compter comme un collaborateur et un ami.

À Karine et Nicolas, j'ai beaucoup apprécié mon apprentissage à vos côtés. Vous avez contribué de façon très importante à ma rigueur et à mon organisation (ou du moins l'amointrissement de mon manque d'organisation...). J'avais souvent bien besoin de cette touche supplémentaire de motivation et vous avez su me la donner à tous les coups. Tous les étudiants ont été très chanceux de vous côtoyer pendant ces années.

C'est au contact des meilleurs que l'on atteint un niveau supérieur d'excellence. Je tiens

donc à rendre hommage à mes collègues étudiants qui ont meublé mon quotidien pendant un peu plus de 6 ans dans le laboratoire. Marc-André et Geneviève ont été mes compagnons de la première heure. C'est avec eux que j'ai appris les rudiments de l'expérimentation animale, de la recherche et de la vie en laboratoire. Les premières années sont pour moi des moments mémorables ou le travail d'équipe était notre valeur la plus importante. Je suis très content de vous avoir rencontrés et de voir les grands scientifiques que vous êtes devenus. Quels que soient vos projets futurs, je suis convaincu que vous les réaliserez avec brio.

Je sais aussi qu'en quittant le laboratoire, je conserverai des relations scientifiques et des relations d'amitiés qui perdureront longtemps. Pascal et Alexandre se sont joints à l'équipe en cours de route et ont constitué les meilleurs éléments possibles à posséder dans une équipe. Merci pour votre apport scientifique et pour les autres bons moments. Alex et Pascal sont devenus plus que des collègues et les moments comiques dans notre rangée de bureau vont beaucoup me manquer. Je vous souhaite beaucoup de succès et j'espère continuer à avoir de vos nouvelles et vous revoir en congrès ou lors de ma prochaine visite à Sherbrooke.

Je remercie également Mylène, Mounir et Jessica, avec qui il était toujours agréable d'avoir de bonnes discussions sur la science et la vie. Je suis également reconnaissant envers la plus récente génération : Myriam, Valérie et Karyn (et David, qui n'est pas si jeune). Je sais que le laboratoire Sarret est entre bonnes mains avec ceux qui restent et j'ai beaucoup appris à vos côtés, entre autres comment être un bon vieux dans une équipe de jeunes...

J'aimerais aussi remercier les différents stagiaires avec qui j'ai travaillé. J'ai eu la chance de superviser de très bons stagiaires et certains d'entre eux ont contribué de façon importante au contenu de cette thèse. Marc, Marylie, Élora et Mélisange ont produit des résultats de qualités et ont tous rivalisés de curiosité et de motivation. Ce fut très motivant pour moi d'être constamment « challengé » par vos questions et vos remarques.

Je n'ai que de bons mots pour les personnes avec qui j'ai collaboré au fil des années. Les

professeurs Louis Gendron, Luc Tremblay et Martin Lepage ont été des seconds mentors pour moi. Les nombreuses discussions que j'ai eues avec vous m'ont fait voir la science sous divers angles et m'ont même parfois aidé à soulager mes angoisses par rapport à mon cheminement. Ces collaborations ont façonné le scientifique que je suis. La direction que j'ai prise pour mes études post-doctorales en est la preuve.

Je remercie également les autres personnes ayant contribué aux divers projets : Valérie Otis, Yongjun Xiao, Mélanie Archambeault, Jean-François Beaudoin, Maxime Paillé, Véronique Dumulon-Perreault, Roger Lecomte, Éric Turcotte, Danny Bélanger, Mark Behlke, Scott D. Rose, Kim A. Lennox et Michael Collingwood. Leur contribution a été essentielle à l'atteinte de mes objectifs.

Finalement, je ne peux passer sous silence la contribution de ma famille dans mon cheminement. Mes parents ont été d'un support constant pendant toutes ces années et m'ont bien fait sentir qu'ils étaient fiers, peu importe la situation.

J'ai aussi la chance de pouvoir compter sur une équipe étoile en terme d'encouragements à tous les jours à la maison. Ma conjointe Vanessa a multiplié les sacrifices afin de me permettre de me réaliser scientifiquement. Je lui serai toujours reconnaissant de m'avoir pousser à donner le meilleur et de m'avoir accompagné dans mes succès et mes déceptions. La principale raison qui me pousse à mettre tous les efforts nécessaires, c'est que je veux la rendre heureuse. Il s'agit là du meilleur moteur possible. J'ai également une pensée précieuse pour mes deux filles. Je dédie tout mon travail à Joséphine et Bernadette, mes sources d'inspiration au quotidien.

Je remercie les membres de mon jury pour avoir généreusement accepté de revoir cette thèse.