

Université de Sherbrooke

Rôle du récepteur opioïde delta dans un modèle de douleur cancéreuse

Par
Valérie Otis
Département de Physiologie et Biophysique

Mémoire présenté
à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2012

Membres du jury d'évaluation
Pr Louis Gendron,
Programmes de physiologie, Département de physiologie et biophysique
Pr Jean-Luc Ardilouze,
Programmes de physiologie, Département de médecine (service d'endocrinologie)
Pr Caroline Saucier,
Programmes de biologie cellulaire, Département d'anatomie et de biologie cellulaire



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: 978-0-494-93319-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-93319-0

NOTICE:

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

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

AVIS:

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

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

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

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

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

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

Canada

Rôle du récepteur opioïde delta dans un modèle de douleur cancéreuse

Par

Valérie Otis

Département de Physiologie et Biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *maître ès sciences* (M.Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

À ce jour, on estime que **60% des cancers**, tous types confondus, formeront des métastases qui vont se loger dans les os. Bien que des avancées majeures aient été réalisées dans la détection et le traitement du cancer, dans le cas du cancer des os les soins ne sont habituellement que palliatifs et la douleur toujours grandissante. **Parmi les douleurs cancéreuses, celle causée par le cancer des os est la plus commune** mais aussi la plus difficile à traiter. À ce jour, les antalgiques de la famille des alcaloïdes (i.e. la morphine et ses dérivés) demeurent la meilleure thérapie pour combattre la douleur due au cancer des os, et ce même si leur utilisation prolongée entraîne des épisodes de tolérance analgésique. Cependant, **dans le cas d'un cancer avancé la dose de narcotiques requise pour lutter adéquatement contre la douleur intense est généralement limitée par l'apparition d'effets indésirables** qui, s'ils ne sont pas contrôlés adéquatement, poussent plusieurs patients à abandonner leurs traitements. La majorité des analgésiques opioïdergiques utilisés en clinique ont pour cible le récepteur opioïde mu, MOPR. Ce récepteur est aussi responsable de la majorité des effets indésirables associés à la prise de narcotiques. Plusieurs données importantes recueillies au cours des dernières années indiquent que l'activation du récepteur opioïde delta, DOPR, ne semble pas entraîner les effets secondaires qu'on associe habituellement aux narcotiques. Nous pensons ainsi que **DOPR, pourrait être une cible thérapeutique intéressante** pour réduire la douleur due au cancer, plus particulièrement celle due au cancer des os. **Ce projet a donc pour but de déterminer si les agonistes sélectifs du récepteur DOPR peuvent représenter une avenue intéressante pour le traitement de la douleur cancéreuse dans un modèle animal de douleur cancéreuse.** La douleur provoquée par le cancer des os a été induite chez le rat Sprague-Dawley par l'injection de cellules cancéreuses originaires d'une tumeur mammaire de rat (MRMT-1) dans la cavité médullaire du fémur. Quatorze jours après l'implantation des cellules cancéreuses dans le fémur, l'administration intrathécale de l'agoniste delta, deltorphine II, a renversé significativement l'allodynie. De plus, nous avons démontré que la deltorphine II soulageait la douleur inflammatoire et cancéreuse de façon comparable. Dans cette étude, nous avons confirmé les effets analgésiques d'un agoniste sélectif des récepteurs opioïdes delta, delorphine II, administré par la voie intrathécale. Les résultats de cette étude montrent, pour la première fois, l'effet analgésique spinale de la deltorphine II dans un modèle de douleur osseuse chez le rat.

Mots clés : Récepteur opioïde delta, cancer des os, allodynie, douleur, analgésie, cellules MRMT-1, adjuvant complet de Freund.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
1 INTRODUCTION	1
1.1 LE CANCER DES OS	1
1.1.1 Épidémiologie	1
1.1.2 Pathophysiologie.....	2
1.1.3 Douleur due au cancer des os	6
1.1.3.1 Mécanisme neuropathique.....	8
1.1.3.2 Mécanisme inflammatoire	11
1.1.4 Modifications neurochimiques du SNC.....	13
1.2 TRAITEMENTS DU CANCER DES OS	17
1.2.1 Gestion de la douleur	17
1.2.2 La tolérance aux opioïdes	24
1.2.3 Les effets secondaires des opioïdes	25
1.2.4 MOPR et le cancer des os	27
1.3 LE RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA	29
1.3.1 Historique.....	29
1.3.2 Localisation.....	30
1.3.3 Fonctions physiologiques	33
1.3.4 Les ligands	33
1.3.4.1 Les ligands delta	33
1.3.4.2 Les ligands endogènes	35
1.3.5 Modulation de la douleur.....	37
1.3.5.1 Effets antinociceptifs de la deltorphine	38
1.3.5.2 Signalisation & trafic cellulaire de DOPR	41
1.4 LE RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA & LE CANCER DES OS	42
1.4.1 Études pré-cliniques.....	42
1.4.2 Études cliniques	43
2 OBJECTIFS DU PROJET	45

3	AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE	47
4	RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	48
5	ARTICLE	49
6	DISCUSSION	74
6.1	RETOUR SUR L'ARTICLE	74
6.2	IMPLICATION DE DOPR DANS LA DOULEUR CANCÉREUSE	74
6.2.1	Rôle de DOPR au niveau spinal	74
6.2.2	Localisation de DOPR	78
6.3	EFFICACITÉ DES MODÈLES ANIMAUX	81
6.3.1	Comparaison des modèles animaux.....	81
6.3.2	Représentativité de la douleur cancéreuse humaine	88
7	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	90
8	REMERCIEMENTS	93
9	RÉFÉRENCES	95
10	ANNEXE	118
	ANNEXE 1	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Signature neurochimique spinale de la douleur inflammatoire, neuropathique et cancéreuse	15
Tableau 2. Thérapies utilisées pour traiter la douleur cancéreuse	19
Tableau 3. Agonistes/Antagonistes du récepteur opioïde delta (DOPR)	34
Tableau 4. Tableau comparatif des différents modèles de douleur due au cancer des os chez la souris et le rat.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Processus de remodelage osseux.....	4
Figure 2. Schéma des différents types de douleurs induites par le cancer des os.....	6
Figure 3. Sensibilisation périphérique des fibres afférentes primaires	8
Figure 4. Composition nerveuse de l'os minéralisé.....	10
Figure 5. Détection des stimuli inflammatoires par un nocicepteur de l'os cancéreux	12
Figure 6. Détection du facteur de transcription ATF-3 dans les neurones de DRG de rats avec une tumeur fémorale	13
Figure 7. Échelle de la gestion de la douleur proposée par l'Organisation mondiale de la Santé.....	18
Figure 8. Images radiographiques de fémur 12 jours suivant l'induction du cancer chez la souris	29
Figure 9. Sites analgésiques des opioïdes delta dans le système nerveux	38
Figure 10. Récepteur opioïde delta (DOPR).....	41
Figure 11. Efficacité de la morphine systémique dans le modèle cancer d'ostéosarcome et le modèle inflammatoire (CFA).....	75
Figure 12. Neuromodulateurs spinaux impliqués dans le mécanisme de la douleur cancéreuse	77
Figure 13. Effets de la palpation du genou sur l'internalisation du complexe substance P et de son récepteur NK-1 dans la moelle épinière de rats cancéreux.....	78
Figure 14. Métastases pulmonaires originaires du cancer osseux chez un rat 14 jours post-chirurgie	84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdiens
ASIC	Canaux ioniques sensibles à l'acidité
ATF-3	Facteur de transcription activateur 3
BR	Récepteur à la bradykinine
CFA	Adjuvant complet de Freund
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine
CIBP	Douleur osseuse induite par le cancer
COX	Cyclo-oxygénase
DAB	Diamino-benzidine
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵] Enkephaline
DOPR	Récepteur opioïdérique delta
DPDPE	[D-Pen ² , D-Pen ⁵] Enkephaline
DRG	Ganglion rachidien
ETR	Récepteur aux endothélines
GFAP	Protéines gliales fibrillaires acides
IB4	Isolectine B4
IL	Interleukine
icv	Intracérébroventriculaire
i.t.	Intrathécale
MOPR	Récepteur opioïdérique mu
MRMT-1	Lignée cellulaire cancéreuse originaire d'une tumeur mammaire de rat
NaV	Canal sodique voltage-dépendant
NGF	Facteur de croissance neuronal
NK1	Récepteur à la neurokinine
NSAIDs	Médicaments anti-inflammatoire non-stéroïdiens
NTI	Naltrindole
OIH	Hyperalgésie induite par les opioïdes
OPG	Ostéoprotégérine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PENK	Pro-enképhaline
SNC	Système nerveux central
SP	Substance P
SP-NK1	Complexe substance P-NK1
TNF	Facteur de nécrose tumoral
TrkA	Récepteur à activité tyrosine kinase de type A
TRPV-1	Récepteur vanilloïde de type 1

1 INTRODUCTION

1.1 LE CANCER DES OS

1.1.1 Épidémiologie

Au Canada, parmi les 177 800 nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2011, au moins 54% sont attribuables au cancer du sein, de la prostate, du poumon, et au cancer colorectal (Statistique Canada, 2011). La majorité des cancers primaires fréquents (sein, prostate, thyroïde, reins et poumons) ont une forte prédilection à générer des métastases osseuses (Coleman, 2006). Bien que les tumeurs malignes primitives de l'os (par exemple l'ostéosarcome et le sarcome d'Edwing), soient extrêmement rares (ils ne représentent que 0,19% de tous les cancers), l'os demeure le troisième site en importance de l'implantation métastatique (après les poumons et le foie) (Tubiana-Hulin, 1991). L'incidence des métastases osseuses lors des examens post-mortem est majeure (Galasko, 1986). Par exemple, trois études indépendantes d'autopsies en 1948, 1979 et 1992 ont montré qu'entre 62-71% des patientes décédées du cancer du sein possédaient des métastases osseuses (Walther, 1948; Cifuentes, 1979; Weiss, 1992). D'autres types de cancer démontrent également une incidence élevée pour l'invasion tumorale osseuse : soit 54-85% des patients atteints du cancer de la prostate; 28-60% de la thyroïde; 33-40% des reins; 32-40% du poumon (Tubiana-Hulin, 1991).

La douleur est une complication redoutée du cancer par la grande majorité des patients atteints qui appréhendent le moment où ils vont la ressentir. Les douleurs associées au cancer peuvent être présentes à tout moment au cours de la maladie, mais la fréquence et l'intensité de la douleur du cancer ont tendance à augmenter conjointement avec les stades du cancer. Une revue systématique de la douleur au cours des 40 dernières années suggèrent que la prévalence de la douleur chez tous les patients atteints de cancer reste élevée, soit 60%, et que cette prévalence varie selon le stade de la maladie du patient. Chez les patients avec un cancer en stade avancé, 62%-86% éprouvent de la douleur significative, décrite comme étant modérée à sévère chez environ 40% -50% et comme très sévère dans 25% -30% des cas (van den Beuken-van Everdingen et al., 2007). La douleur due au cancer des os est le type de douleur le plus commun chez les

patients en stade avancé, et les deux tiers des patients atteints de douleurs osseuses métastatiques souffrent de douleurs sévères (Coleman, 2006; Mercadante et Fulfaro, 2007). Ainsi, tous les patients atteints de cancer ne souffrent pas de douleurs mais la grande majorité l'expérimente au stade palliatif de la maladie. Malgré les nouvelles approches de traitement au cours des 20-30 dernières années, une proportion importante de patients continue à vivre au quotidien avec une douleur modérée à sévère difficile à contrôler.

1.1.2 Pathophysiologie

Les métastases osseuses suivent un processus en plusieurs étapes pour arriver au site d'ancrage. Les cellules des tumeurs primaires, du cancer du poumon ou du sein, se multiplient et envahissent les tissus normaux adjacents. Lors de leur croissance, ces cellules cancéreuses pénètrent les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour se disperser dans différents organes (Berretoni, 1986). La majorité des cellules métastatiques arrivent à destination via une voie hématogène. Le système veineux, par opposition au système artériel, est particulièrement important dans le plexus paravertébraux Batson qui est le système veineux pelvien. Le squelette axial et proximal des longs os sont deux sites avec une forte propension à la participation métastatique en raison des communications entre le plexus veineux et la grande vascularisation de la moelle rouge trouvée dans ces endroits anatomiques (Galasko, 1986). Bien que les cellules tumorales peuvent progresser vers tous les organes, elles adhèrent préférentiellement à la surface endothéliale de la moelle osseuse du fémur chez certains patients atteints du cancer du sein (Lee Y. T., 1983).

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules cancéreuses sont attirées par des sites et tissus spécifiques selon 'the seed and soil hypothesis' postulé par Paget en 1889. Cette hypothèse stipule que la migration des cellules tumorales dans certains tissus de l'organisme n'est pas due au hasard, mais que certaines cellules cancéreuses (en référence « seed ») ont une affinité spécifique pour certains organes (en référence « soil ») qui lui fourniront les facteurs particuliers pour croître (Paget, 1989). Suivant cette théorie, les cellules tumorales mammaires qui forment des métastases dans le squelette adhèrent à la

surface endo-osseuse en raison de la présence de facteurs spécifiques d'attractions. L'os constitue un endroit de prédilection pour les métastases mammaires puisqu'il dispose d'un micro-environnement composé d'ostéoblastes, d'ostéoclastes, d'un vaste réseau sanguin ainsi que la présence de facteurs de croissance locaux (NGF), de cytokines inflammatoires et d'hormones favorisant l'invasion et la croissance tumorale.

Lors de l'établissement des cellules cancéreuses dans l'os, l'homéostasie de l'os est perturbée par les métastases engendrant un déséquilibre du système de remodelage osseux. Dans un état physiologique normal (Figure 1A), l'os est constitué de cellules spécialisées comprenant les ostéoblastes, responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire, les ostéocytes, responsables de la maintenance du métabolisme osseux, et les ostéoclastes, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. L'architecture normale de l'os est maintenue et renouvelée grâce à l'activation des ostéoclastes (résorption osseuse) et des ostéoblastes (formation de l'os) (Szczeny, 2002). L'activation des ostéoclastes et la libération de facteurs de croissance (secondaire à une résorption osseuse) activent les ostéoblastes, qui sécrètent la matrice ostéoïde. Au fil du temps, il y a minéralisation pour former une nouvelle matrice osseuse. L'équilibre de ce cercle vicieux est strictement maintenu avec de nombreuses boucles de rétroaction positives et négatives (Troen, 2003). Il est à noter que des influences systémiques telles que les hormones (parathormone, calcitonine, les oestrogènes, les stéroïdes), les vitamines (vitamine D), et l'immobilité, entre autres, ont également un impact sur la résorption ou la formation d'os.

Dans un état physiologique osseux perturbé par la présence de métastases

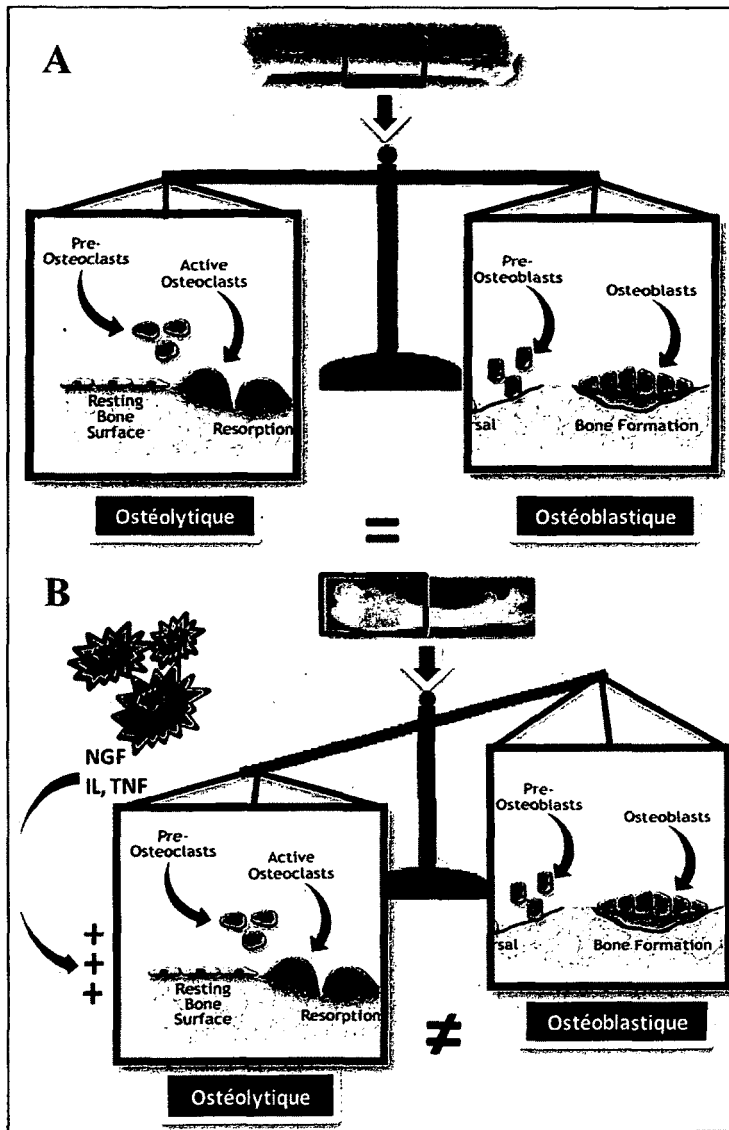


Figure 1. Processus de remodelage osseux. A-Dans un état physiologique normal, un remodelage constant de la structure osseuse dépend de l'équilibre dynamique entre la formation de l'os effectuée par les ostéoblastes et la résorption osseuse (destruction de l'os) produit par les ostéoclastes. B-Dans un état pathologique, les cellules cancéreuses vont sécréter des facteurs de croissance et des cytokines favorisant ainsi l'activité ostéolytique de l'os, créant ainsi un déséquilibre du remodelage osseux. Source: Schéma réalisé par Valérie Otis. Images : <http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/img/bo ne.jpg>

osseuses, l'homéostasie de l'os est déséquilibrée engendrant deux types possibles de lésions : ostéolytique ou ostéoblastique. Ces lésions résultent d'un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse (Figure 1B). Les lésions ostéolytiques, caractéristiques du cancer du sein, sont causées par un excès de l'activité des ostéoclastes par rapport à l'activité ostéoblastique, conduisant à une destruction accrue de l'os (Guise et al., 2006). Le rapport de deux études sur les animaux et les humains souffrant de douleur due au cancer des os ont suggéré que les ostéoclastes jouent un rôle important dans la perte osseuse induite par le cancer (Lipton, 2006) et contribuent à l'étiologie de la douleur du cancer des os (Mantyh, 2006). Les ostéoclastes résorbent l'os

tout en générant un microenvironnement extracellulaire acide par la libération de protons contribuant à la génération de la douleur osseuse. Les deux types de pathologies, ostéolytique (destruction osseuse) et ostéoblastique (formation osseuse), sont caractérisés par la prolifération des ostéoclastes et une hypertrophie (Halvorson et al., 2006). Dans le cancer du sein, les lésions ostéolytiques provoquées par les ostéoclastes sont trouvées dans 80% des patients de stade IV de la maladie (Kozlow et Guise, 2005) et sont caractérisées par une activité anormalement élevée des ostéoclastes (Kakonen et Mundy, 2003).

Au-delà de la douleur, les métastases osseuses peuvent entraîner plusieurs autres problèmes graves, notamment des fractures pathologiques, des complications neurologiques (comme la compression des nerfs ou de la moelle épinière), une hypercalcémie, la thrombose veineuse profonde et une embolie pulmonaire. Une fracture pathologique, secondaire à une fragilité osseuse accrue, survient chez 8-30% des patients atteints de métastases osseuses (Mercadante, 1997). La fracture est commune dans les lésions osseuses ostéolytiques et est donc plus probable chez les patients atteints de carcinome mammaire. Les os le plus souvent fracturés sont le fémur (50%) et l'humérus (15%), principalement dans la partie proximale de l'os (Nielsen et al., 1991). La complication la plus grave est la compression de la moelle épinière. Comme les métastases osseuses affectent généralement les zones du squelette où la moelle rouge est située, les tumeurs provoquent la suppression de la moelle osseuse causant des symptômes et signes d'anémie, d'infections et d'hémorragie. De plus, 5-10% de tous les patients atteints de cancer sont affectés par une hypercalcémie au cours de leur maladie (Coleman, 1997). L'hypercalcémie est particulièrement fréquente dans le cancer du sein, le myélome multiple et le carcinome du poumon.

Les métastases du squelette contribuent principalement à la morbidité et mortalité dans le cancer métastatique. Tôt ou tard les métastases vont s'accompagner de douleur venant compromettre la survie et surtout la qualité de vie des patients (Coleman, 2006, 2008).

1.1.3 Douleur due au cancer des os

Une fois les cellules tumorales métastasées au squelette, les mécanismes de douleurs osseuses se développent graduellement. La douleur initiale est habituellement décrite comme sourde de caractère, constante dans la présentation, et augmentant progressivement en intensité et fréquence avec l'avancement de la maladie (Dy et al., 2008). Puisque les thérapies contre le cancer ont augmenté en efficacité, la durée de vie des patients est significativement prolongée et, conséquemment, la persistance et la gravité des douleurs osseuses souvent intensifiées. Aux stades avancés du cancer, 75-95% des patients souffrent de douleurs cancéreuses sous plusieurs formes, y compris une hypersensibilité locale (hyperalgésie ou allodynie) au toucher, à la chaleur ou au froid, une douleur due à un mouvement et une douleur continue (van den Beuken-van Everdingen et al., 2007). Dans la littérature, il est reconnu que la douleur osseuse est une combinaison de la douleur continue (aussi nommée douleur de fond ou basale) et de la douleur idiopathique (également appelée douleur intermittente), inclue la douleur spontanée (non-volontaire) et la douleur incidente induite par le mouvement (volontaire) (Figure 2) (Mercadante et Arcuri, 1998; Portenoy et Frager, 1999).

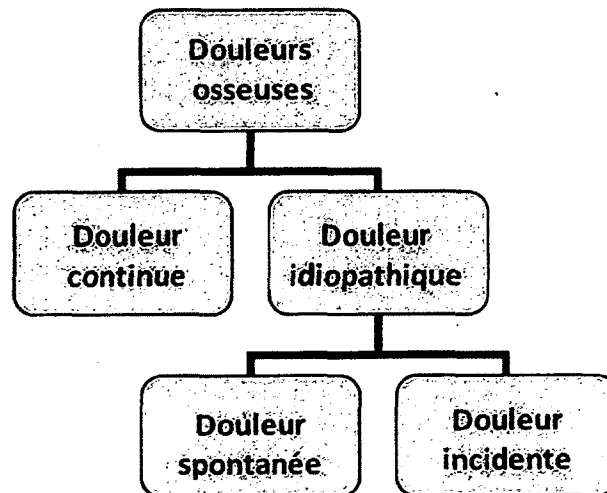


Figure 2. Schéma des différents types de douleurs induites par le cancer des os. La douleur osseuse est composée de douleur continue également appelée douleur de fond ou basale et de douleur idiopathique aussi nommée intermittente. La douleur idiopathique est catégorisée en 2 types de douleurs distinctes soit la douleur spontanée (non-volontaire) et la douleur incidente (volontaire, évoquée par le mouvement). Source : Tirée et adaptée de (Middlemiss et al., 2001)

La douleur continue de longue durée est décrite comme une douleur initialement constante qui augmente progressivement au fil du temps (Mercadante, 1997). Elle apparaît graduellement sur une période de plusieurs semaines ou mois, devenant progressivement plus sévère en intensité. Elle se manifeste par une profonde sensation de courbatures ou une sensation de brûlures et peut être accompagnée par des épisodes d'inconfort. La douleur continue est la représentation la plus fréquente des douleurs osseuses (Coleman, 1997). La douleur est habituellement bien localisée à un ou plusieurs zones spécifiques de l'os pouvant être identifiées par le patient avec une certaine facilité. D'autres termes sont utilisés dans la littérature médicale pour décrire le même phénomène, y compris « la douleur basale » et « la douleur de fond » (Ferrell et al., 1999).

La douleur idiopathique est définie comme une exacerbation transitoire de la douleur qui survient spontanément (« douleur spontanée »), ou en relation avec un déclencheur prévisible ou imprévisible (« douleur incidente »), généralement en dépit du traitement antalgique en cours. Plus la destruction de l'os progresse, plus les épisodes intermittents d'une douleur aiguë intense sont fréquents ; ils peuvent survenir spontanément ou provoqués lors d'un mouvement comme la marche, le déplacement du poids et la palpation de l'os atteint (Portenoy et al., 1999). Un sondage mené par l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) a révélé que la douleur intermittente était présente, selon les cliniciens, chez 65% des patients atteints de cancer (Caraceni et Portenoy, 1999; Caraceni et al., 2004). Dans l'étude de Portenoy en 1999, près des deux tiers des patients ont pu identifier un facteur déclenchant pour leur douleur, comme le déplacement d'un poids ou lors d'un mouvement. Cependant, près de la moitié des patients ont également déclaré que leur douleur était imprévisible à certains moments. Les métastases osseuses sont la cause la plus fréquente de cette douleur incidente prévisible et imprévisible. En effet, le mouvement lié à la douleur incidente volontaire est une cause majeure de morbidité, d'autant que ce type de douleur peut être très difficile à contrôler (Davies, 2005).

Au cours de la dernière décennie, la douleur liée au cancer des os a suscité l'intérêt des scientifiques pour l'étude des mécanismes sous-jacents afin de développer de nouvelles thérapies pour mieux contrôler la douleur cancéreuse (Honore et al., 2000a; Halvorson et al., 2005; Sevcik et al., 2006). Grâce aux récents modèles animaux de douleur cancéreuse, l'étude de la douleur cancéreuse a permis de mieux comprendre les mécanismes qui génèrent et maintiennent la douleur. Ces efforts ont permis d'émettre une hypothèse suggérant que la douleur cancéreuse est une douleur unique ayant une composante à la fois neuropathique et inflammatoire (Schwei et al., 1999).

1.1.3.1 Mécanisme neuropathique.

Les neurones sensoriels afférents primaires sont la passerelle par laquelle l'information sensorielle provenant des tissus périphériques est transmise à la moelle épinière et au cerveau ; ces neurones sensoriels innervent tous les organes du corps, sauf le cerveau. Les corps cellulaires des fibres sensorielles qui innervent la tête et le corps sont logés dans le ganglion de la racine du nerf trijumeau et de la racine dorsale (DRG), respectivement. Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories : 1) les fibres A

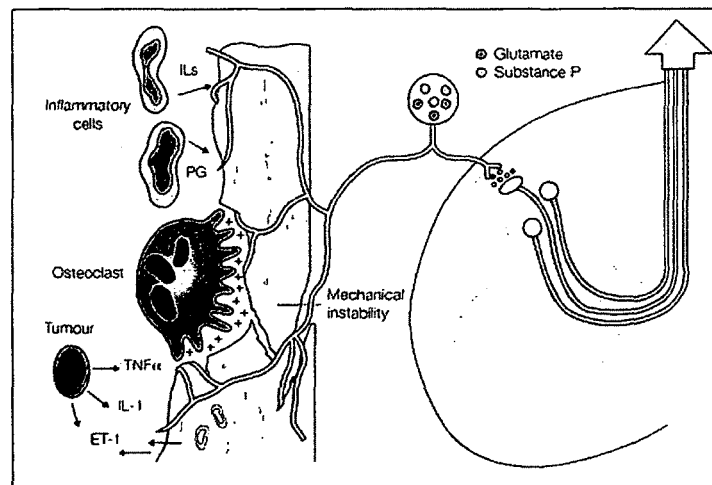


Figure 3. Sensibilisation périphérique des fibres afférentes primaires. La relâche de composés pro-nociceptifs (prostaglandines, interleukines, cytokines) par la tumeur et/ou les cellules inflammatoires combinée à l'instabilité et la fragilité de l'os génèrent une activation accrue des nocicepteurs périphériques. Le signal douloureux produit se propage aux corps cellulaires des fibres afférentes (DRG), se poursuit dans la corne dorsale de moelle épinière pour ensuite être transmis aux centres supérieurs. Source : Tirée du Textbook of Pain, Wall et Melzack, 5^e Édition-www.textbookofpain.com

myélinisées de grand calibre et 2) les petites fibres C non-myélinisées et A légèrement myélinisées. Ces fibres C et A, non-myélinisées et légèrement myélinisées, sont impliquées dans la génération de la douleur chronique qui accompagne de nombreux cancers (Mantyh et al., 2002). Suite à une lésion tissulaire induite par les cellules tumorales ou associée à la tumeur, les nocicepteurs modifient leur patron de synthèse des neurotransmetteurs, des récepteurs, et de l'expression des facteurs de croissance ; même les seuils d'activation aux stimuli sont changés. Il y a développement de la sensibilisation périphérique (Figure 3) afin qu'une stimulation normalement non-douloureuse soit maintenant perçue comme un stimulus douloureux, ce qui entraîne un état de douleur neuropathique chronique (Mantyh, 2006). Autant chez les animaux de laboratoire que les humains, les neurones sensoriels afférents primaires innervent l'os minéralisé ainsi que son périoste (tissu fibreux qui recouvre la surface externe de l'os). De nombreux nerfs se localisent dans le périoste et d'autres entrent dans l'os via les vaisseaux sanguins. Ce qui est clair dans les études, c'est que tout os minéralisé et sa moelle osseuse sont innervés par les neurones sensoriels et que cette innervation est moindre par rapport à l'innervation sensitive du périoste (Bjurholm et al., 1988; Tabarowski et al., 1996). Il existe une innervation dense en fibres sensibles de type CGRP+ et NF200 dans le périoste et le fémur (Figure 4) (Mach et al., 2002). Mach et ses collègues ont examiné l'innervation du fémur de souris normales par immunohistochimie, microscopie confocale, et reconstruction d'image tridimensionnelle. Ils ont montré que le fémur est remarquablement riche et hétérogène en fibres sensorielles sympathiques tout au long du périoste, de l'os minéralisé, et de la moelle osseuse. Puisque les neurones sensoriels et sympathiques sont présents dans la moelle osseuse, l'os minéralisé, et le périoste, le système sensoriel est affecté par les fractures, l'ischémie, ou la présence de cellules tumorales. Les fibres sensorielles de ces neurones présents dans ces compartiments jouent un rôle dans la génération et la maintenance de la douleur du cancer des os. En examinant les modifications dans la structure des nerfs innervant les os porteurs de tumeurs ostéolytiques, les scientifiques ont observé la présence des fibres sensorielles au cœur et au pourtour de la tumeur dans les régions profondes du stroma (Urch C., 2004; Martin C. D. et al., 2007). De plus, ces fibres nerveuses sensorielles affichent une apparence discontinue et fragmentée, ce qui suggère que les fibres sensorielles périphériques ont

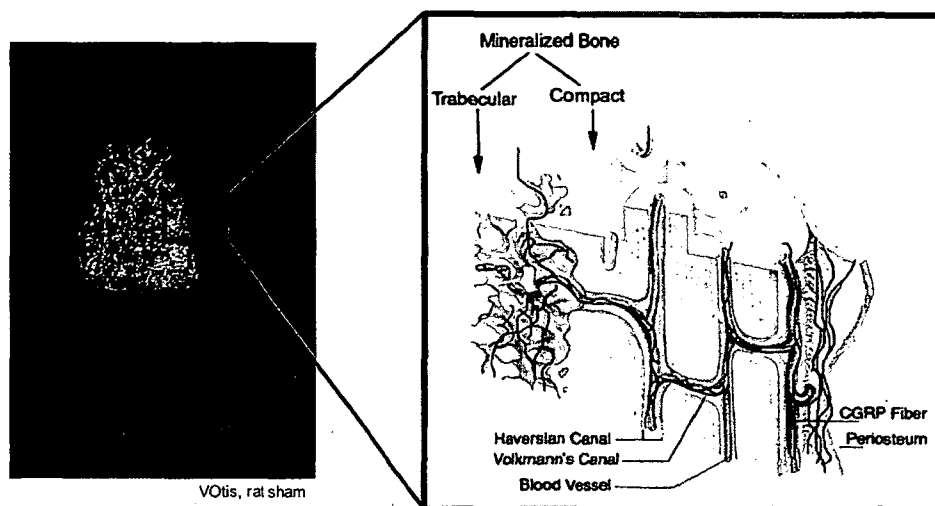


Figure 4. Composition nerveuse de l'os minéralisé. L'os se compose de 2 types de structure osseuse : l'os trabéculaire et l'os compact. Dans l'os trabéculaire et compact, les petites fibres CGRP sont présentes et organisées selon le réseau de micro-vaisseaux. Les fibres CGRP sont particulièrement abondantes dans le périoste de l'os, membrane protectrice entourant l'os. Source : Tirée et adaptée de (Mach et al., 2002)

ultimement été détruites par les cellules tumorales envahissantes. Les ostéoblastes, par la formation anarchique et compensatoire d'os, peuvent également comprimer les terminaisons nerveuses logées dans la moelle, la matrice osseuse et le périoste générant une douleur neuropathique.

De plus, la résorption de l'os due à l'activation ostéoclastique accrue diminue la densité osseuse et perturbe l'architecture squelettique générant des microfractures. Les tumeurs ostéolytiques par leur phénotype agressif vont réduire la résistance mécanique et la stabilité de l'os porteur de la tumeur de sorte qu'un effort mécanique normalement inoffensif peut maintenant provoquer des distorsions mécanosensibles des fibres nerveuses sensorielles qui innervent l'os (Halvorson et al., 2006). Les mouvements induits par la douleur incidente peuvent alors activer des nocicepteurs mécanosensibles normalement silencieux. L'étirement du périoste par expansion de la tumeur, le stress mécanique induit par l'os affaibli, une compression du nerf par la tumeur ou la destruction directe de l'os sont tous des mécanismes associés à la douleur neuropathique (Campa et Payne, 1992).

Ces résultats suggèrent que la tumeur confinée dans l'os génère une composante de la douleur cancéreuse principalement par les lésions et la compression des fibres afférentes primaires.

1.1.3.2 Mécanisme inflammatoire

Les tumeurs envahissent progressivement l'espace médullaire de l'os permettant aux cellules cancéreuses de générer une inflammation locale dans l'os. Dans la plupart des cancers, la masse tumorale est composée de cellules tumorales mais également de nombreux autres types cellulaires constituant le stroma tumoral y compris les cellules immunitaires contribuant à la réponse inflammatoire. Le stroma tumoral et les zones nécrosées de la tumeur présentent généralement un pH extracellulaire inférieur comparativement aux tissus normaux de la matrice extracellulaire. Comme les cellules inflammatoires et immunitaires envahissent le stroma tumoral, elles libèrent également des protons qui génèrent une acidose locale, ce qui réduit le pH environnant à $\text{pH} \leq 5$ (Griffiths, 1991). La constatation que les neurones sensoriels peuvent être directement excités par les protons ou les acides provenant des ostéoclastes et de la tumeur a généré un intérêt clinique en recherche sur la douleur (Sutherland et al., 2000). Des études ont montré que les sous-ensembles de neurones sensitifs expriment différents canaux ioniques sensible à l'acide (Olson et al., 1998; Julius et Basbaum, 2001) tels que les « acid sensing ion channels » (ASIC-3) et le « transient receptor potential vanilloid 1 » (TRPV1) (Figure 5) (Basilana et al., 1997; Caterina et al., 2000). Ces canaux sont sensibilisés et excités par la diminution du pH. Les canaux ASIC ont une colocalisation avec les fibres nociceptives CGRP⁺, petites fibres afférentes primaires, tels que celles qui innervent le fémur. Une étude a montré que TRPV1 est exprimé par un sous-ensemble de fibres C des neurones sensoriels qui innervent le fémur de la souris (Ghilardi et al., 2005).

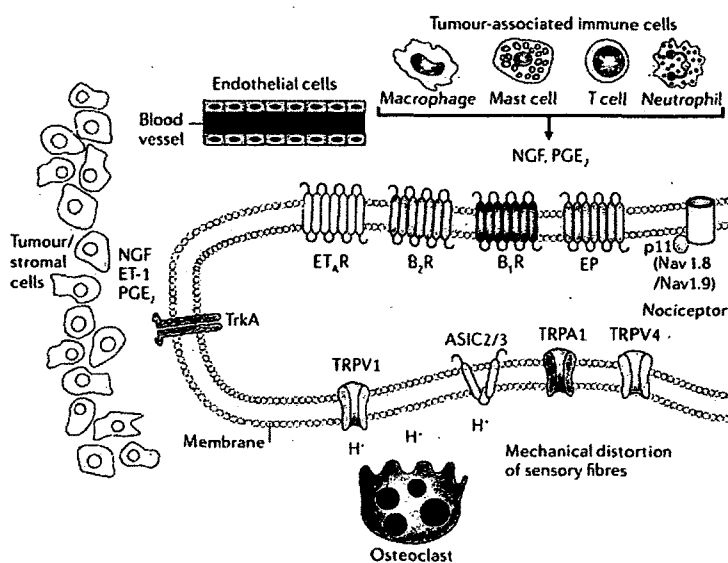


Figure 5. Détection des stimuli inflammatoires par un nocicepteur de l'os cancéreux. Les nocicepteurs possèdent plusieurs types de récepteurs (ETR, BR, TrkA) et canaux (TRPV1, ASIC, NaV) capables de détecter et transmettre le signal douloureux des stimuli produits par les cellules cancéreuses et immunitaires. Les nombreux médiateurs chimiques relâchés dans le micro-environnement osseux créent une acidose locale amplifiant l'activation des récepteurs nociceptifs ce qui contribue aux mécanismes de la douleur induite par le cancer des os. Source : (Mantyh, 2006)

Par ailleurs, un nombre croissant de cytokines pro-inflammatoires classiques, et plus récemment, des chimiokines, ont été associés aux douleurs cancéreuses (Sommer et Kress, 2004; Gosselin et al., 2008). En plus d'agir comme médiateurs inflammatoires, les cytokines peuvent également interagir spécifiquement avec les récepteurs et les canaux ioniques neuronaux pour réguler l'excitabilité neuronale, la sensibilité aux stimuli externes, et la plasticité synaptique. Non seulement le pH acide, mais une multitude de facteurs sécrétés par les cellules tumorales et les cellules inflammatoires tels que les prostaglandines, cytokines (TNF- α), endothélines, interleukines IL-1 et IL-6, facteurs de croissance (NGF), peuvent sensibiliser et activer directement les afférences primaires (Abbadie, 2005; Schafers et Sorokin, 2008). Un bon nombre des récepteurs de ces facteurs sont exprimés par les afférences primaires innervant l'os contribuant ainsi à la dépolarisation des neurones et à la transmission d'un signal de douleur.

Prises ensemble, ces données indiquent que la douleur induite par les métastases osseuses est le résultat d'interactions complexes entre les cellules tumorales, les cellules osseuses, le micro-environnement osseux et les fibres afférentes primaires. Ces

interactions engendrent une sensibilisation des neurones périphériques contribuant à générer des modifications spinales et centrales.

1.1.4 Modifications neurochimiques du SNC

Suite à un dommage subit aux nerfs périphériques, il y a une grande plasticité dans le système nerveux périphérique et central qui est directement liée à la pathogenèse des différents stades de douleur neuropathique. Les mécanismes sous-jacents à ces états de douleur chronique sont hétérogènes. La nature complexe de ces syndromes est largement

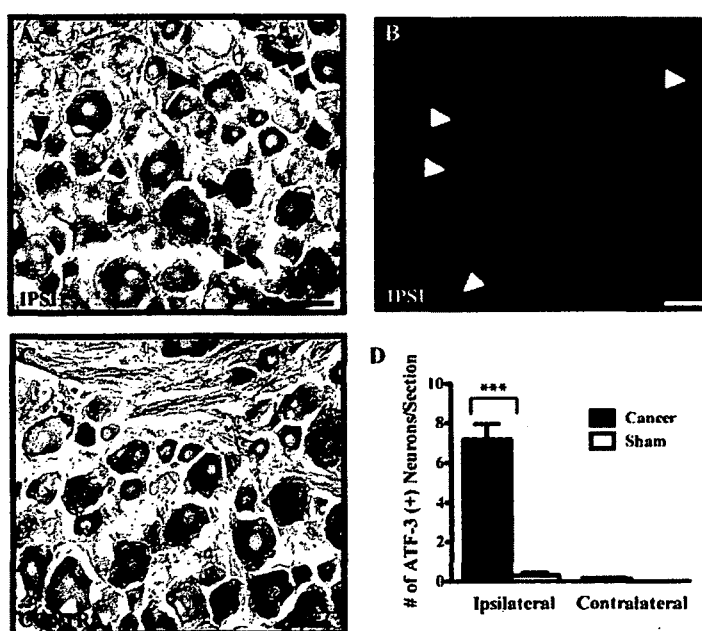


Figure 6. Détection du facteur de transcription ATF-3 dans les neurones de DRG de rats avec une tumeur fémorale. Les DRG ipsilatéraux, au jour 14 post-induction du cancer, montrent la présence d'ATF-3 dans leurs noyaux par immunohistochimie en DAB (A) et par immunofluorescence (B). Tandis que dans les DRG controlatéraux, le facteur de transcription n'a pas été détecté (C). La quantification des neurones positifs pour ATF-3 est significativement plus élevée chez les animaux cancéreux que chez les contrôles (sham). Source : (Dore-Savard L, Otis V. et al. 2010)

responsable du nombre limité de stratégies thérapeutiques. La séquence d'événements qui suit une lésion du nerf périphérique peut être vue à différents niveaux du système nerveux. La lésion nerveuse est associée à des changements (Yaksh, 1997) anatomiques, pharmacologiques, électrophysiologiques et neurochimiques.

Chez des animaux ayant un sarcome, notre équipe a montré une augmentation de l'expression d'ATF-3, un facteur de transcription activateur (Figure 6) (Dore-Savard et al., 2010). ATF-3 est un membre de la famille des facteurs de transcription ATF / CREB, qui n'est pas exprimé à

des niveaux détectables dans des conditions normales dans les neurones sensoriels ni suite à une lésion des nerfs périphériques dans les modèles de douleur neuropathique (Tsujino et al., 2000). Il est probable que l'expression d'ATF-3 dans les neurones sensoriels des animaux porteurs de tumeurs est le résultat de lésions induites par la tumeur et la destruction des extrémités distales des fibres nerveuses sensitives et sympathiques qui innervent l'os. La destruction des fibres nerveuses sensorielles dans le modèle de sarcome a été également accompagnée de modifications neurochimiques dans les ganglions spinaux de la racine dorsale (DRG). Les neurones sensoriels qui innervent le fémur porteur de la tumeur ont démontré une régulation positive de la galanine et une hypertrophie des cellules satellites entourant les corps cellulaires des neurones sensoriels. De plus, une augmentation des cellules gliales fibrillaires acides (GFAP) et une infiltration macrophagique du DRG ipsilatéral ont été notées (Honore et al., 2000a). Des changements neurochimiques similaires ont été décrits après une lésion du nerf périphérique et dans d'autres états de douleur neuropathique non cancéreuse (Halvorson et al., 2005).

L'information obtenue à partir de modèles animaux suggère que la corne dorsale de la moelle épinière subit également des modifications importantes, ce qui la rend hypersensible. Ainsi, les neurones de la moelle épinière qui devraient normalement être réceptives aux stimuli nocifs deviennent sensibles aux stimuli non nocifs. Honore et ses collègues ont comparé les changements neurochimiques qui se produisent dans la moelle épinière et les neurones afférents primaires de souris C3H/HeJ souffrant de douleur cancéreuse avec celle ayant de la douleur inflammatoire et neuropathique (Tableau 1) (Honore et al., 2000b). Les résultats immunohistochimiques dans le modèle d'ostéosarcome de souris C3H/HeJ indiquent que les altérations dans la corne dorsale sont différentes de ceux observées dans la douleur inflammatoire et neuropathique. La régulation à la hausse de la dynorphine, un peptide pro-hyperalgésique, est observée seulement dans le modèle de douleur osseuse induite par le cancer (CIBP) et le modèle inflammatoire. Alors que pour la douleur neuropathique et inflammatoire, les changements pro-inflammatoires tels que la régulation positive du CGRP et SP, ou des changements pro-neuropathiques tels que l'augmentation du neuropeptide Y, ne sont pas

	Inflammation CFA	Neuropathy spinal nerve ligation	Neuropathy sclerotic nerve transection	Cancer sarcoma into the bone
Spinal cord				
SP lam I-II (IF)	↑	↓↓↓	↓↓↓	↔
CGRP lam I-II (IF)	↑	↓↓↓	↓↓↓	↔
IB4 lam Ii (IF)	↔	↓↓↓	↓↓↓	↔
Galanin lam I-II (IF)	↔	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↔
Somatostatin lam I-II (IF)	↔	↔	↔	↔
NPY lam I-II (IF)	↔	↑↑	↑	↔
Dynorphin lam I-II (IF)	↔	↔	↑	↔
SPR lam I-II (IF)	↑	↔	↔	↔
PKCγ lam Ii (IF)	↑↑	↑↑	↑	↔
GAP-43 lam I-II (IF)	↔	↑↑↑	↑	↔
NeuN gray matter (IF)	↔	↔	↔	↔
Dynorphin lam III-VI (count)	↑↑	↔	↔	↑↑↑
Glia				
GFAP gray matter (IF)	↔	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑↑↑
Ox42 gray matter (IF)	↔	↑↑↑	↔	↔
Motoneurons				
NeuN motoneurons (count)	↔	↔	↓↓↓	↔
Galanin motoneurons (count)	↔	↑↑	↑↑	↔
NPY motoneurons (count)	↔	↑↑↑	↑↑↑	↔

Tableau 1. Signature neurochimique spinale de la douleur inflammatoire, neuropathique et cancéreuse. Les changements neurochimiques observés dans chaque modèle de douleur sont distincts. La douleur induite par l'ostéosarcome semble seulement modifier 2 paramètres, soit l'augmentation de la dynorphine et du GFAP, marqueur astrocytaire, comparativement aux nombreux changements détectés dans les autres modèles. Légende : (↔) signifie aucun changement, (↑) indique une augmentation et (↓) une diminution de l'intensité d'immunofluorescence (IF) ou du nombre (count). Source : (Honore et al. 2000a)

vus dans le CIBP (Schwei et al., 1999; Honore et al., 2000c). Des évidences pour une sensibilisation centrale dans la moelle épinière du modèle cancer se manifestent par l'expression accrue de la protéine c-fos (Dore-Savard et al., 2010) et l'internalisation du complexe substance P récepteur de la neurokinine 1 suite à des stimuli douloureux (Honore et Mantyh, 2000). Ces résultats suggèrent que les modifications neurochimiques de la douleur inflammatoire, neuropathique et cancéreuse chez les souris C3H/HeJ ont une signature neurochimique distincte et unique pour la douleur cancéreuse.

Par ailleurs, il existe aussi une grande plasticité dans les systèmes de transmission et de modulation de ces états de douleurs chroniques afin que les systèmes évoluent dans le temps. Un tel mécanisme implique aussi l'activation gliale. La glie, présente dans le

système nerveux central, est importante dans la perception de la douleur. Lorsqu'une douleur chronique existe, les cellules gliales sont activées, ce qui entraîne la libération de substances chimiques qui peuvent amplifier la douleur. Dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat, l'augmentation de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP, un marqueur des astrocytes) et Iba1 (un marqueur de la microglie) ont été détectées sur le côté ipsilatéral mais pas controlatéral, suggérant un rôle dans la génération et la maintenance de la douleur cancéreuse (Honore et al., 2000c; Dore-Savard et al., 2010). La glie, incluant les astrocytes et la microglie, dans la moelle épinière est impliquée dans le développement d'une douleur persistante dans les tissus inflammatoires et les nerfs affectés par la tumeur.

Suite à une perturbation des neurones sensoriels par le cancer osseux, les zones de la moelle épinière et du système nerveux central impliquées dans le traitement de l'information somatosensorielle subissent également une variété de changements neurochimiques et cellulaires, appelée sensibilisation centrale, qui facilite la transmission de l'information nociceptive douloureuse et non-douloureuse. Ainsi, pendant le développement du cancer, il y a probablement un remodelage cellulaire et neurochimique lent et progressif à la fois périphérique et central qui inhibe, facilite ou modifie différemment la transmission d'informations à partir des fibres périphériques endommagées jusqu'au cortex cérébral. Les altérations physiopathologiques dans la CIBP ne sont pas simplement confinées à la périphérie, mais s'étendent vers le cerveau et la voie descendante facilitatrice et inhibitrice (Apkarian et al., 2005). La voie ascendante des neurones de projection de la lamina I s'effectue majoritairement via la zone parabrachiale (par exemple, l'hypothalamus, l'amygdale), qui représente la composante affective du sentiment de la douleur. Cependant, cela peut rendre la perception de la CIBP aussi troublante et désagréable, pouvant mener à des comportements anxieux et dépressifs (Portenoy et Hagen, 1990). Les altérations des centres supérieurs par la CIBP n'ont pas encore été explorées en détails.

1.2 TRAITEMENTS DU CANCER DES OS

1.2.1 Gestion de la douleur

La majorité des patients atteints d'un cancer peuvent obtenir soulagement de leur douleur lorsque celle-ci est évaluée de manière adéquate, si un traitement approprié est donné et si une réévaluation appropriée est faite de façon régulière. Le traitement de la douleur osseuse est très individualisé et peut impliquer l'une ou plusieurs des stratégies suivantes : le traitement symptomatique de la douleur continue, le traitement symptomatique de la douleur idiopathique, le traitement de la pathologie sous-jacente (par exemple la résorption de l'os) et le traitement du cancer sous-jacent (cibler les métastases). De nombreuses directives pour la gestion de la douleur cancéreuse ont été approuvées par les organisations non gouvernementales, les associations professionnelles, et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). L'échelle analgésique de l'OMS a été développée comme un guide universel clinique qui doit être applicable partout dans le monde. Il se doit donc d'être simple et d'inclure des options thérapeutiques potentiellement accessibles à tous. L'échelle de l'OMS permet de contrôler la douleur chez 80% des patients atteints de cancer, et chez 75% des personnes en phase terminale de la maladie (Von Roenn et al., 1993).

Traitement symptomatique de la douleur continue

Le traitement symptomatique de la douleur osseuse est basé sur les lignes directrices produites par l'OMS (OMS, 1996). Les lignes directrices favorisent cinq grands principes pour la gestion pharmacologique de la douleur:

1. Les médicaments doivent être administrés par voie orale (si possible).
2. Les médicaments doivent être donnés régulièrement.
3. Les médicaments sont donnés de manière progressive suivant l'échelle de l'OMS.
4. Les médicaments opioïdiques doivent être ajustés individuellement.
5. Le souci du détail doit être omniprésent tout au long du traitement.

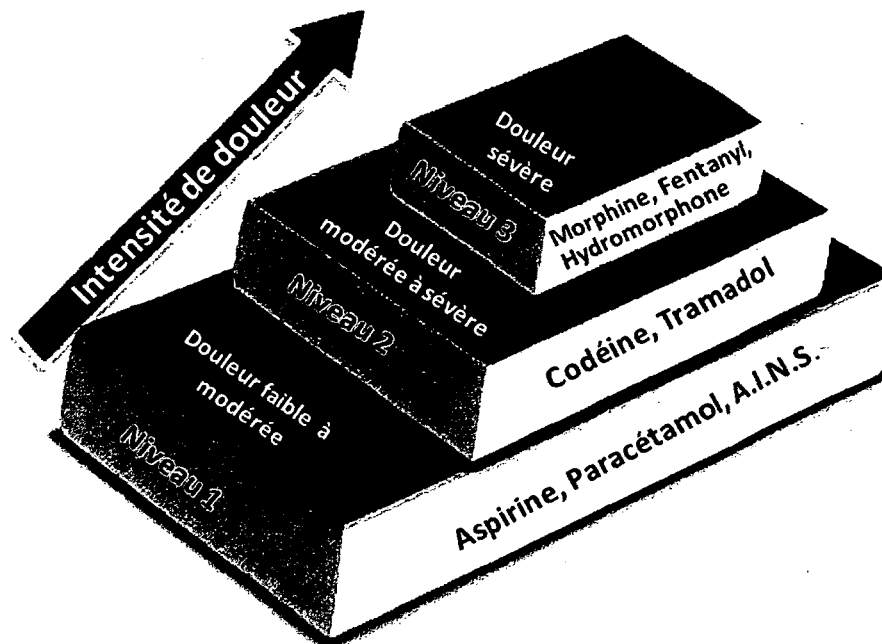


Figure 7. Échelle de la gestion de la douleur proposée par l'Organisation mondiale de la Santé. Il y a trois niveaux de traitement de la douleur en fonction de l'intensité ressentie par le patient. Au premier niveau, pour une douleur qualifiée de faible à modérée, les analgésiques non-opioïdiques comme les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (A.I.N.S.) sont utilisés. Lorsque la douleur augmente et devient modérée à sévère, les opioïdes légers sont préconisés comme la codéine et le tramadol. Au troisième niveau, quand la douleur est sévère et insupportable, l'administration d'opioïdes forts comme la morphine, le fentanyl ou l'hydromorphone est recommandée. Source : (Organisation mondiale de la Santé, 1996).

Traitement symptomatique de la douleur intermittente

Selon l'OMS (Figure 7), les analgésiques opioïdiques sont le pilier du traitement analgésique et sont classés en fonction de leur capacité à contrôler la douleur. À la deuxième étape de l'échelle, on retrouve les opioïdes agissant sur la douleur légère y compris la codéine, la dihydrocodéine, le tramadol, la dextropropoxyphène. À l'étape trois, les opioïdes les plus couramment utilisés en soins palliatifs sont la morphine, l'oxycodone, le fentanyl, l'hydromorphone, la méthadone. Depuis quelques années, la rotation des opioïdes et de leurs différentes combinaisons a pour objectif, dans les deux cas, d'améliorer le contrôle de la douleur et de réduire les effets secondaires. À l'heure actuelle, il n'existe pas d'études contrôlées portant sur ces pratiques. Cependant, trois

principes ont été proposés pour une meilleure gestion de la douleur intermittente (spontanée et incidente) (Portenoy, 1997) :

1. Mise en place de thérapies ciblant l'étiologie sous-jacente de la douleur.
2. Optimisation des médicaments administrés sur un calendrier fixe.
3. Interventions pharmacologiques ou non-pharmacologiques pour la douleur intermittente.

Il a été suggéré que l'augmentation de la médication suivant un calendrier fixe peut prévenir ou limiter la douleur idiopathique associée au CIBP (Mercadante et al., 2004). La méthode la plus courante pour contrôler ce type de douleur reste l'utilisation de médicaments de secours oraux, soit la morphine, l'hydromorphone et l'oxycodone.

Les adjuvants ou co-analgésiques sont des médicaments qui sont principalement destinés à un usage autre que l'analgésie, mais qui peuvent avoir un effet antinociceptif dans des situations particulières (Tableau 2) (Mantyh et al., 2002) . Les coanalgsésiques sont des médicaments administrés en conjonction avec les anti-inflammatoires non-

Drug class	Mechanism of action	Effect	Indication	Complications
NSAIDs	COX1 and COX2 synthesis blockade	Analgesia, anti-inflammatory	Mild to moderate pain, bone pain, inflammation, enhance opioid effects	Bleeding, gastrointestinal ulceration, renal toxicity, ceiling effect
Opioids	μ -opioid receptor antagonism in the peripheral and central nervous systems	Analgesia	Moderate to severe pain	Constipation, nausea/vomiting, sedation, respiratory depression
Radiation	Destruction of dividing cells	Analgesia, tumour shrinkage	Primary therapy	Mucositis/pruritis, fatigue, nausea/vomiting
Systemic radioisotopes	Destruction of cells	Analgesia, tumour shrinkage	Therapy for bone metastasis	Myelosuppression
Corticosteroids	Multiple mechanisms	Analgesia, anti-inflammatory	Central nervous system oedema, spinal-cord and nerve or plexus compression, bone pain	Dysphoria, weight gain, dyspepsia, oropharyngeal candidiasis, diabetes mellitus, aseptic bone necrosis
Local anaesthetic	Blockade of sodium channels on peripheral nerves	Local anaesthesia	Cutaneous/mucosal pain, intrathecal application for severe pain	Short lasting, potential for tissue injury
Antidepressants	Inhibition of serotonin and NE re-uptake	Analgesia, mood modification	Neuropathic pain, musculoskeletal pain	Anticholinergic side effects, sedation, hypotension, cardiotoxicity seizures
Bisphosphonates	Cause apoptosis of osteoclasts in mineralized bone	Analgesia, tumour shrinkage, suppression of osteolysis	Lytic and blastic bone pain	Gastrointestinal tract toxicity, fever, electrolyte abnormalities

COX, cyclooxygenase, NE, norepinephrine, NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Tableau 2. Thérapies utilisées pour traiter la douleur cancéreuse.

L'utilisation de plusieurs stratégies pharmacologiques selon différents mécanismes d'action est employée afin d'atténuer la douleur cancéreuse. Les opioïdes agissant sur le récepteur opioïdes mu sont fréquemment utilisés ainsi que les NSAIDs, les agents anesthésiants locaux, la radiothérapie, les biphosphonates et plusieurs autres. Source : (Mantyh et al. 2002).

stéroïdiens (AINS) et les opiacés pour améliorer l'activité analgésique des médicaments, diminuer la dose requise d'opiacés et réduire les effets indésirables.

Étant donné que la douleur inflammatoire est une composante reconnue de la douleur osseuse (Honore et Mantyh, 2000), l'administration concomitante d'inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX) peut s'avérer une stratégie utile pour la gestion efficace de la douleur tout en limitant les effets secondaires indésirables des opioïdes. Les AINS réduisent la biosynthèse des prostaglandines par inhibition de la cyclo-oxygénase (COX) impliquée dans la cascade d'événements inflammatoires qui causent, amplifient, ou maintiennent la nociception. Les AINS sont recommandés à l'étape 1 de l'échelle analgésique, mais ils peuvent aussi être utilisés en combinaison avec des opiacés aux étapes 2 et 3 de cette échelle.

Une revue systématique d'essais cliniques contrôlés randomisés des AINS pour la douleur cancéreuse a été publiée en 2004 (McNicol et al., 2004). Cette revue incluait 42 essais portant sur 3084 patients. L'étude a conclu que les AINS sont efficaces pour le traitement à court terme de la douleur cancéreuse, et qu'il n'y avait pas de preuve pour soutenir une efficacité supérieure d'un AINS par rapport à un autre. Ces résultats étaient en accord avec ceux d'une étude antérieure (Eisenberg et al., 1994) et avec une autre étude portant sur le traitement générique de la douleur cancéreuse (Carr et al., 2004).

Traitement de la pathologie sous-jacente

À ce jour, il existe peu de traitements disponibles pour bloquer la croissance des métastases osseuses. La croissance tumorale au site secondaire est l'étape limitante la plus favorable à cibler plutôt que l'extravasation des cellules tumorales dans la circulation, puisque son mécanisme est aujourd'hui mieux connu et décrit. Les thérapies les plus attractives sont celles qui vont bloquer la résorption osseuse (biphosphonates), empêcher l'activation et la prolifération des ostéoclastes (ostéoprotégérine) ou inhiber l'activation des facteurs de croissance osseux (anti-NGF) nécessaires à la résorption osseuse. Certains de ces traitements sont déjà applicables chez l'humain (biphosphonates, ostéoprotégérine) alors que les autres (anti-NGF, TRPV1) sont encore au stade expérimental.

a) Biphosphonates

L'utilisation des bisphosphonates est un traitement bien établi pour les maladies osseuses associées au cancer (Krempien et al., 2005). Les biphosphonates interfèrent avec la résorption osseuse, inhibent la fixation des cellules tumorales à l'os et initient l'apoptose des cellules tumorales. Une fois pris par les ostéoclastes, ils entraînent la perte de fonction et, finalement, l'apoptose des ostéoclastes. Les études animales et cliniques du cancer des os ont rapporté que le traitement anti-résorptif des bisphosphonates peut réduire la douleur et la destruction osseuse induite par la tumeur, et la croissance tumorale dans l'os (Mantyh, 2006; Lipton, 2008; von Moos et al., 2008). Dans une étude clinique utilisant l'alendronate bisphosphonate chez des patients atteints de métastases osseuses, une réduction significative du nombre d'ostéoclastes et de l'activité des ostéoclastes a été observée (Major et al., 2000).

Les effets analgésiques des biphosphonates peuvent être observés peu après l'initiation du traitement, bien que les principaux effets analgésiques ne soient présents qu'après plusieurs mois de traitement. Les biphosphonates de première et de deuxième génération peuvent réduire la douleur osseuse résultant d'un cancer du sein métastatique et d'un myélome, mais ne conduisent pas à une réduction statistiquement significative de la douleur après 1-2 ans de traitement (Hortobagyi et al., 1998). Actuellement, des études cliniques sont en cours pour clarifier l'effet des bisphosphonates sur la douleur osseuse, la croissance tumorale et les métastases osseuses. Les bisphosphonates sont approuvés et fréquemment utilisés pour la réduction de la destruction osseuse et de la douleur due au cancer des os, malgré les effets secondaires engendrés y compris l'induction d'arthralgies et d'ostéonécrose de la mâchoire (Drake et al., 2008). Il serait essentiel de démontrer que les biphosphonates peuvent augmenter la survie des patients atteints du cancer des os.

b) Ostéoprotégérine

L'ostéoprotégérine (OPG) est une protéine soluble sécrétée par les ostéoblastes membres de la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF). Cette protéine empêche l'activation et la prolifération des ostéoclastes en jouant le rôle de récepteur-piège pour le ligand RANK-L bloquant ainsi son action sur les ostéoclastes (Simonet et al., 1997). L'OPG peut diminuer les comportements douloureux dans le modèle cancer du sarcome

de souris (Luger et al., 2001). Ces résultats suggèrent qu'une partie substantielle des actions de l'OPG semble résulter de l'inhibition de la résorption osseuse via une réduction de la fonction des ostéoclastes.

c) Anti-NGF

Le traitement par des anticorps anti-NGF peut être particulièrement efficace dans le blocage de la douleur du cancer des os, car le facteur de croissance neuronale (NGF) semble être intégralement impliqué dans la régulation à la hausse, la sensibilisation et la désinhibition des neurotransmetteurs multiples, des canaux ioniques et des récepteurs des fibres afférentes primaires des DRG.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle une thérapie anti-NGF serait efficace dans la réduction de la douleur du cancer des os, l'efficacité analgésique de l'anti-NGF a été examinée dans un modèle d'ostéosarcome ostéolytique de souris qui expriment des taux élevés de NGF (Sevcik et al., 2005) et dans un modèle ostéoblastique murin où l'expression du NGF par les cellules tumorales est indétectable (Halvorson et al., 2005). Dans ces deux modèles, ils ont démontré que l'administration d'un anticorps anti-NGF a été très efficace dans la réduction à la fois du cancer des os et de la douleur en stade précoce et tardif de la maladie. Ces données suggèrent qu'en bloquant l'action du NGF sur son récepteur par un anticorps ou l'inactivation du récepteur TrkA peuvent être des cibles thérapeutiques intéressantes à investiguer pour bloquer la douleur du cancer des os, peu importe si la tumeur exprime ou non le NGF. Vraisemblablement, dans le cas où les cellules tumorales n'expriment pas NGF, les cellules stromales expriment et sécrètent le NGF assurant l'efficacité d'une thérapie anti-NGF.

d) L'antagoniste du TRPV-1

Compte tenu de la localisation stratégique de TRPV1, des études ont évalué son rôle potentiel dans la douleur cancéreuse. L'antagoniste du TRPV-1 et la diminution de son expression par l'ARN interférent atténuent de façon significative la douleur évoquée et continue dans un modèle de cancer murin (Ghilardi et al., 2005; Niiyama et al., 2007). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle et l'implication de TRPV-1 dans le signal douloureux du cancer des os.

Traitement du cancer sous-jacent

Les thérapies complémentaires reliées au traitement propre du cancer sous-jacent sont maintenant reconnues comme des éléments essentiels. Le rôle principal du traitement complémentaire est de réduire la taille et les métastases soit par un traitement de radiothérapie, de chimiothérapie ou d'hormonothérapie.

Radiothérapie

La radiothérapie peut être appliquée de manière curative ou palliative pour traiter la douleur due aux métastases chez les patients où un autre traitement n'est pas possible. Plusieurs essais cliniques ont montré que la radiothérapie est efficace pour le traitement palliatif des métastases osseuses douloureuses (Roos et al., 2000; Hoskin et al., 2001; Saarto et al., 2002). Cependant, le mécanisme de la radiothérapie pour soulager la douleur n'est pas clair. Les mécanismes possibles incluent la mort des cellules tumorales, la mort des cellules hôtes concernées (par exemple les macrophages), ou l'activation/induction de cytokines impliquées dans le remodelage osseux. Somme toute, la radiothérapie apporte un soulagement significatif de la douleur dans un délai relativement court comparativement aux biphosphonates. La radiothérapie et la chimiothérapie ont un rôle fondamental dans le contrôle des symptômes et favorisent une approche intégrée de la gestion du cancer.

Traitements non-pharmacologiques

Une variété de méthodes non-pharmacologiques peuvent être complémentaires aux méthodes pharmacologiques dans le traitement des douleurs intermittentes. Ces méthodes comprennent l'acupuncture, la neurostimulation électrique transcutanée (Zeppetella et Ribeiro, 2003), le massage (Fine et Busch, 1998), les techniques de relaxation (Portenoy, 1997), les techniques de distraction (Petzke et al., 1999) et la psychothérapie de soutien qui ont montré, chez des patients sélectionnés, avoir un impact favorable. Toutefois, les preuves d'efficacité de ces techniques dans la gestion de la douleur osseuse sont limitées, voir absentes.

1.2.2 La tolérance aux opioïdes

Même si l'utilisation des antalgiques est à ce jour la meilleure thérapie pour atténuer la douleur cancéreuse, de nombreux obstacles limitent ce type de traitement. En particulier, l'opinion des médecins, des patients et des familles peut devenir des obstacles à leur utilisation. Ces préoccupations incluent souvent la crainte des dépendances physiques et de la toxicomanie. L'administration d'opioïdes, en particulier à des doses élevées, peut être associée au développement de la tolérance opioïdurgique menant à de graves effets secondaires parfois débilissants, y compris la dépression respiratoire, la sédation, l'hyperalgésie, la constipation et les nausées (Bruera, 1997).

La tolérance aux opiacés est définie comme une réduction de l'effet d'une même dose d'opiacé après une exposition répétée ou lorsque les doses de plus en plus élevées doivent être administrées pour obtenir l'effet analgésique obtenu avec la dose initiale. En termes pharmacologiques, la tolérance est la réduction de la puissance analgésique qui peut être illustrée quantitativement par un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse pour l'analgésie et une augmentation du ED₅₀, ou dose efficace moyenne (Foley, 1991).

Il est essentiel de définir ici les termes « tolérance », « dépendance physique » et « dépendance psychologique ». La dépendance physique se réfère à un état physiologique altéré produit par l'administration répétée d'opioïdes qui nécessite l'administration continue d'opioïdes pour prévenir l'apparition d'un syndrome stéréotypé, le syndrome de sevrage ou d'abstinence. En revanche, la dépendance psychologique aux opiacés est un comportement qui se caractérise par les habitudes, l'état affectif et le style de vie d'un individu en association positive au souvenir plaisant lors de la consommation. La dépendance psychologique provient généralement de l'usage compulsif de la substance afin d'assouvir l'envie extrême de consommer pour ressentir de nouveau les effets et l'état plaisant en dépit de toute douleur physique (Foley, 1991).

L'utilité clinique des opioïdes pour traiter la douleur peut être limitée de manière significative par le développement de la tolérance analgésique qui peut se produire chez de nombreux patients recevant une thérapie à long terme. De multiples facteurs peuvent

contribuer à augmenter la dose chez les patients cancéreux, y compris les modifications de la fonction opioïdérique endogène, la progression de la maladie, et le développement d'hyperalgésie induite par les opioïdes (OIH) (Silverman, 2009). Un certain degré de tolérance à l'analgésie semble se développer dans la plupart des patients recevant chroniquement des analgésiques opioïdériques (McQuay, 1999). Cependant, il est difficile d'effectuer des essais contrôlés randomisés sur le développement de la tolérance à l'administration chronique d'opiacés.

1.2.3 Les effets secondaires des opioïdes

Les nombreux effets indésirables des opiacés sont reconnus depuis longtemps, mais certains ont été plus clairement identifiés au cours des 20 dernières années. Les mécanismes qui sous-tendent ces effets néfastes ne sont que partiellement compris et semblent dépendre d'un certain nombre de facteurs, incluant l'âge du patient, l'étendue de la maladie, le dysfonctionnement des organes, l'administration concomitante de certains médicaments, l'exposition antérieure aux opiacés, et la voie d'administration du médicament (Bruera, 1997). Les effets indésirables couramment associés au traitement par les opioïdes peuvent être répartis en quatre domaines :

1. Système nerveux central (SNC) : dépression respiratoire, somnolence, hyperalgésie, délire, agitation, euphorie, hallucinations, troubles cognitifs, rêves, myoclonies, troubles épileptiques.
2. Gastro-intestinaux (GI) : constipation, nausées, vomissements.
3. Système nerveux autonome : bouche sèche, rétention urinaire, hypotension orthostatique.
4. Cutanée : démangeaisons, transpiration.

Dépression respiratoire

La dépression respiratoire est potentiellement l'effet indésirable le plus grave. L'action des agonistes morphiniques sur les centres respiratoires du tronc cérébral va produire, en fonction de la dose, une dépression respiratoire qui peut aller jusqu'à l'apnée. Chez l'homme, la mort des suites d'une surdose d'un analogue de la morphine est souvent le résultat d'un arrêt respiratoire. Chez les patients souffrant de dépression respiratoire, la

réduction de la dose, l'arrêt ou la rotation des opioïdes sont des techniques recommandées. Le naloxone peut être administré dans une solution diluée à de petits incréments pour éviter les symptômes de sevrage (Walsh, 1984).

Sédation

Les analgésiques opioïdiques produisent sédation et somnolence. La sédation est un effet indésirable fréquent qui limite la quantité d'opiacés utilisables. Le phénomène se produit fréquemment chez les patients lorsque les opioïdes sont débutés ou en augmentant la dose de façon significative. La tolérance à l'effet sédatif des opioïdes se produit dans les 3-7 jours suivant l'administration, ou lorsque les opiacés sont donnés assez longtemps (Bruera et al., 1989).

Hyperalgésie

L'hyperalgésie induite par les opioïdes (OIH) est une entité clinique dans laquelle les patients ressentent une aggravation de la douleur et des symptômes anormaux tels que l'allodynie, en dépit de l'augmentation des doses d'opioïdes. Des études cliniques ont rapporté que les opioïdes administrés de manière aiguë par différentes voies (transdermique, orale, par voie intrathécale ou intraveineuse) peuvent produire de l'hyperalgésie et de l'allodynie, en particulier pendant l'escalade rapide des doses d'opioïdes (Mercadante et Portenoy, 2001; Mercadante et al., 2003). De récentes études cliniques ont indiqué que OIH peut survenir aussi chez l'homme suite à l'exposition chronique aux opiacés (Angst et Clark, 2006; Chu et al., 2006). L'hyperalgésie est maintenant acceptée comme une réalité clinique et doit être différenciée de la tolérance aux opiacés.

Constipation

La constipation survient chez environ 90% des patients traités par les opioïdes. Ces médicaments agissent à des sites multiples dans le tractus gastro-intestinal et la moelle épinière pour diminuer dans les sécrétions intestinales et le péristaltisme, résultant en des selles sèches et la constipation. D'ailleurs, l'opium a été employé historiquement pour la réduction de la dysenterie et les troubles diarrhéiques de par ses actions périphériques (Demeulenaere et al., 1974). L'utilisation chronique des opiacés est une

situation préoccupante dans la gestion de la douleur cancéreuse, car les opiacés constituent une pierre angulaire du traitement. Afin de réduire les effets constipants des opiacés, les patients reçoivent systématiquement des laxatifs titrés en fonction de la dose d'opiacés reçue.

Nausées et vomissements

Les opioïdes analgésiques provoquent des nausées et des vomissements par une action sur la zone médullaire chémoréceptrice. Les nausées ont été rapportées pour être présentes dans 8% -35 % des patients recevant des opioïdes, et des vomissements chez environ 14%-40% (Campora et al., 1991). Alternativement, un antiémétique peut être utilisé en combinaison avec l'opioïde. Les patients exposés aux opioïdes pour la première fois, ou ceux qui subissent une augmentation significative de la dose, devraient avoir d'emblé des antiémétiques.

En supposant que les effets indésirables soient imputables à la thérapie aux opiacés, ils peuvent être gérés par la réduction de la dose, une hydratation adéquate, la prise en charge symptomatique de certains effets négatifs et la commutation des opioïdes (également nommé la rotation des opioïdes ou substitution) (Cherny et al., 2001). Malheureusement, chez certains patients, les effets secondaires deviennent si intolérables et incontrôlables qu'ils abandonnent leur traitement.

La grande majorité des effets secondaires, décrits précédemment, sont médiés par l'action des agonistes morphiniques via le récepteur mu. Des études ont clairement montré qu'en absence du récepteur mu opioïdérique (MOPR) chez la souris l'administration de morphine n'induit pas d'analgésie ni de dépression respiratoire, de constipation et de dépendance physique (Kieffer et Evans, 2002). Ces résultats confirment que le récepteur MOPR médie la majorité des effets secondaires indésirables associés à la morphine et ses analogues.

1.2.4 MOPR et le cancer des os

La morphine est l'opioïde le plus fréquemment utilisé pour le traitement de la douleur cancéreuse modérée à sévère, même si son efficacité n'est pas toujours soutenue

au cours d'un traitement continu et à long terme (plusieurs mois ou années) (Slatkin, 2009).

Les effets prolongés de l'administration soutenue d'opioïdes en présence d'un état de douleur persistante, tels que la douleur due au cancer des os, ont récemment été examinés (King et al., 2007). L'administration soutenue de la morphine par mini-pompes osmotiques, conçu pour maintenir les niveaux plasmatiques constants durant 7 jours, augmente la douleur induite par le cancer dans un modèle murin de sarcome. De plus, la perfusion soutenue de morphine augmente l'expression des neurotransmetteurs excitateurs soit la substance P, le CGRP et le glutamate dans les fibres afférentes primaires (Powell et al., 2000; Gardell et al., 2002; King et al., 2005), ce qui suggère un potentiel d'amplification du signal nociceptif chez les animaux traités par la morphine. Ces données indiquent que la perfusion de morphine continue peut entraîner des mécanismes additifs de la douleur au-delà de ceux qui sont produits par le sarcome lui-même. Il est inquiétant de constater que la morphine délivrée par mini-pompes osmotiques accélère la dégradation de l'os et double l'incidence de fracture dans un modèle murin de douleur induite par un sarcome, ce qui vraisemblablement contribue à la douleur accrue observée chez les souris traitées à la morphine en continu (Figure 8) (King et al., 2007). De plus, dans un modèle d'ostéosarcome de souris comparé à un modèle inflammatoire (CFA), il a été montré que la dose de morphine nécessaire pour réduire la douleur cancéreuse est 4 fois plus élevée que dans le modèle CFA (Luger et al., 2002). Ces études pré-cliniques suggèrent que la morphine produit des dommages osseux majeurs augmentant la fragilisation de l'os et l'incidence de fractures et nécessite des doses très élevées pour contrer la douleur induite par le cancer des os.

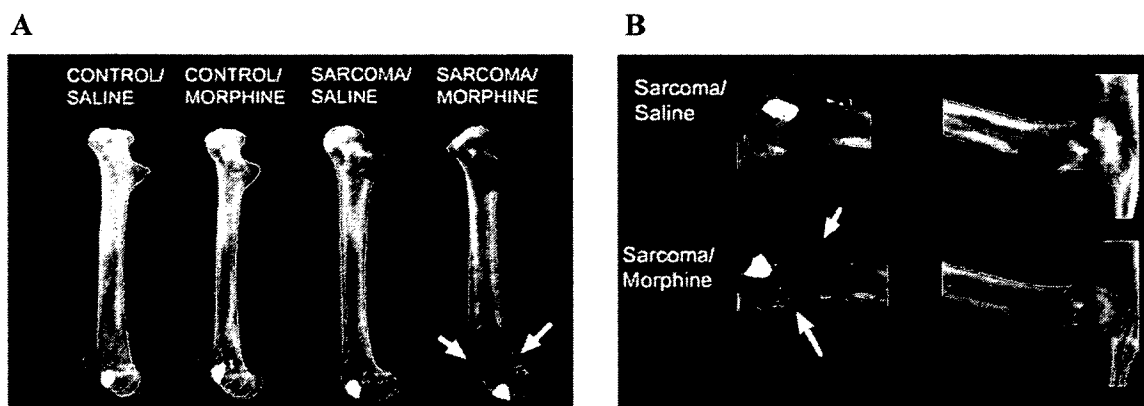


Figure 8. Images radiographiques de fémur 12 jours suivant l'induction du cancer chez la souris. A-L'ostéosarcome induit la destruction de l'os dans la partie distale du fémur. Le traitement à la morphine pendant 5 jours a amplifié la fragilisation de l'os comparativement aux animaux traités saline. B-Un grossissement des images indique (flèches blanches) la présence de microfractures dans le fémur traité à la morphine. Source : (King T et al., 2007)

1.3 LE RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA

1.3.1 Historique

La découverte d'un récepteur sélectif aux opioïdes en 1973 a généré beaucoup d'intérêt auprès des chercheurs afin de comprendre les mécanismes endogènes du contrôle de la douleur pour mener au développement de nouveaux analgésiques (Pert et Snyder, 1973). L'existence de trois récepteurs distincts aux opiacés, nommés mu, kappa et sigma a été postulé par Martin R.W. suite à l'observation des différents changements du comportement (dysphorie, délire, hallucinations) des canins souffrant de douleur neuropathique ayant reçu des opiacés (Martin W. R. et al., 1976). Entre 1977 et 1979, John Hughes, Hans Kosterlitz et leurs collègues ont fourni des preuves de l'existence du récepteur opioïde delta, 2 ans après la découverte des enképhalines (Lord et al., 1977). Ces chercheurs ont démontré que la Leu-enképhaline était plus puissante que la morphine pour inhiber la contraction du muscle du canal déférent isolé de souris. En utilisant les canaux déférents isolés de souris et les préparations d'iléons isolées de cobayes, ils ont également proposé l'existence d'un récepteur préférentiellement exprimé dans le canal déférent de souris qu'ils ont appelé le récepteur delta (pour le canal déférent) distinct du récepteur mu, kappa et sigma proposés par le groupe de Martin. Aujourd'hui, le canal déférent de souris est un outil reconnu pour l'étude des actions des opioïdes.

L'identification d'un récepteur pour les enképhalines endogènes a conduit à des recherches sur les propriétés physiologiques et pharmacologiques de ces ligands endogènes et sur le récepteur delta lui-même. La compréhension de ces propriétés et mécanismes est en progression depuis environ 40 ans.

La percée scientifique la plus importante de la biologie des récepteurs delta est venue avec le premier clonage du récepteur opioïde. Chris Evans (Evans et al., 1992) et Brigitte Kieffer (Kieffer et al., 1992) ont simultanément rapporté le clonage du récepteur delta ce qui a conduit à la confirmation de l'existence de ce récepteur dans les tissus de souris et de rats. Puis en 2000, Filliol et ses collègues ont réussi à générer les toutes premières souris avec le récepteur opioïde delta non-fonctionnel, modèle qui constitue un outil efficace pour les études physiologiques et pharmacologiques (Filliol et al., 2000). En 1994, le récepteur humain delta a été cloné (Knapp et al., 1994). Ce dernier présente une homologie de séquence élevée (93%) avec le rat et la souris ; la plupart des différences se situent en position N et C-terminale de DOPR.

1.3.2 Localisation

Les récepteurs opioïdes delta sont ubiquitaires dans le SNC en particulier dans plusieurs structures anatomiques importantes pour la transmission (ganglions de la racine dorsale, moelle épinière) et l'intégration (cerveau) du signal douloureux.

Dans le cerveau, la localisation de DOPR a été identifiée par RT-PCR et Northern blot dans la région corticale, l'hippocampe, le noyau caudé, le noyau accumbens ainsi qu'à plus faible intensité, dans les sections médullaires et mésencéphaliques (Simonin et al., 1994). Par la technique d'hybridation *in situ*, une analyse détaillée de la localisation de DOPR a été réalisée chez le rat (Bzdega et al., 1993). L'ARN messager de DOPR a été trouvé dans le cortex, l'hippocampe, les noyaux hypothalamiques, les noyaux pontiques et l'olive inférieure (Bzdega et al., 1993). Similairement, l'autoradiographie effectuée dans les sections de cerveau de rats avec le [D-Pen², D-Pen⁵] enképhaline tritié, [³H] DPDPE, a également montré de fortes densités du récepteur opioïde delta dans l'amygdale, le caudate putamen, le noyau accumbens, le bulbe olfactif, et de faible densité de liaison dans le cervelet, le bulbe rachidien et la corne dorsale de la moelle épinière (Gulya et al.,

1986). Les études d'autoradiographie et d'hybridation *in situ* ont clairement démontré la présence de DOPR ou de son ARNm dans les mêmes structures neuroanatomiques des voies ascendantes et descendantes de la douleur (Mansour et al., 1994; Mansour et al., 1995).

Les études utilisant l'immunoréactivité (anticorps anti-DOPR) ont également confirmé la distribution de DOPR dans les zones essentielles de la transmission du message nociceptif. L'immunomarquage pour le récepteur opioïde delta a permis d'identifier dans les noyaux du nerf trijumeau, les noyaux parabrachial et raphé, et aussi dans la substance grise périaqueducule (PAG) (Arvidsson et al., 1995). En général, il y a un accord cohérent entre les distributions des récepteurs opioïdes delta identifiés par autoradiographie ou par hybridation *in situ* (Ableitner, 1994). Les sites neuroanatomiques importants pour le traitement et la modulation de la douleur comprennent la PAG, les noyaux raphé et parabrachial, l'amygdale (Mansour et al., 1994; Mansour et al., 1995).

Dans la moelle épinière, l'identification a été faite par autoradiographie quantitative, par hybridation *in situ* et par immunohistochimie a démontré la présence évidente du récepteur opioïde delta dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Besse et al., 1991; Mansour et al., 1994; Arvidsson et al., 1995; Mansour et al., 1995; Cahill et al., 2001b). Chez le rat, le récepteur opioïde delta est principalement présent dans les terminaisons axonales des laminae I et II (Cheng et al., 1995) détecté par immunofluorescence et microscopie électronique (Honda et Arvidsson, 1995). De plus, l'immunomarquage des ultrastructures des neurones permettent de voir clairement la localisation vésiculaire de DOPR dans la moelle (Cheng et al., 1995). Des études utilisant la microscopie optique et électronique ont révélé la localisation cellulaire de DOPR dans deux endroits distincts des neurones de la moelle épinière soit à faible densité (5%) dans la membrane plasmique et à forte densité (95%) dans le cytoplasme (Cahill et al., 2001a). L'expression de l'ARNm du récepteur opioïde delta a été détectée dans les neurones moteurs de la corne ventrale de la moelle épinière (Mansour et al., 1994).

Dans les ganglions de la racine dorsale (DRG), les études d'hybridation *in situ* ont montré une forte concentration de l'ARNm du DOPR, en particulier dans les neurones de grand diamètre, et en fait dans tous les types et diamètres de neurones (Dado et al., 1993; Mansour et al., 1994; Minami et al., 1995; Zhang X. et al., 1998; Wang et Wessendorf, 2001; Mennicken et al., 2003). Sur la base de ces études, il a été admis qu'environ 50% des récepteurs opioïdes mu et 67% des récepteurs opioïdes delta se situent présynaptiquement sur les fibres afférentes primaires (Cahill et al., 2001a; Abbadie et al., 2002), préférentiellement dans les neurones peptidergiques (Beaudry et al., 2011). Les résultats obtenus par microscopie électronique ont montré un immunomarquage significatif pour DOPR sur les axones non myélinisés et les terminaisons axonales (Cahill et al., 2001a). Prises ensemble, ces études fournissent des preuves irréfutables que le récepteur opioïde delta est anatomiquement situé dans les voies modulatrices de la douleur.

Les récepteurs opioïdes delta sont présents dans le SNC. Ils sont aussi présents dans le système nerveux entérique pour médier les effets des opioïdes sur certains aspects de la fonction digestive, entre autre la constipation. Des sites de liaisons spécifiques mixtes pour mu et delta ont été localisés chez des cobayes dans le plexus sous-muqueux, le muscle circulaire du fundus gastrique et chez le rat dans l'intestin grêle, la muqueuse iléale, l'antré gastrique et la muqueuse duodénale (Nishimura et al., 1986; Dashwood et al., 1990). Chez l'homme, MOPR et DOPR se situent dans les neurones et les fibres du plexus myentérique du côlon sigmoïde (James et al., 1987).

Les récepteurs opioïdes impliqués dans la régulation de la fonction cardiovasculaire ont été localisés dans les myocytes cardiaques et les terminaisons nerveuses autonomes (May et al., 1989). Des études de liaison ont montré la présence du récepteur opioïde delta et kappa dans les myocytes ventriculaires du myocarde de rats (Zhang W. M. et al., 1996). Ventura et ses collaborateurs ont démontré que les récepteurs kappa et delta sont présents sur les membranes du sarcolemme de coeurs de rats (Ventura et al., 1989).

1.3.3 Fonctions physiologiques

Les interactions entre les différents types de récepteurs opioïdes ont été documentées dans de nombreux essais *in vivo* et *in vitro*. La signification pharmacologique de ces interactions a lentement émergée. Les indications thérapeutiques au-delà de l'analgésie ont également vu le jour, entre autres du fait de leur rôle antidépresseur. Plusieurs régions du cerveau où se trouvent DOPR font partie du système limbique associé au contrôle de l'émotion et du comportement de récompense. Ces zones comprennent le tubercule olfactif, le noyau accumbens et l'amygdale. De récentes études ont montré que les agonistes delta peuvent avoir une activité antidépressive au cours du test de la nage forcée (Broom et al., 2002), et du test de l'auto-administration d'opioïdes chez les singes (Negus et al., 1994) ce qui semble dévoiler de nouvelles fonctions de DOPR dans le système limbique. Grâce aux souris déficientes pour le gène DOPR, le rôle de DOPR dans le contrôle des réponses émotionnelles a été clarifié en observant des comportements antidépressifs chez ces souris (Jutkiewicz et al., 2005).

La découverte du récepteur delta dans les myocytes cardiaques a conduit à l'exploration par Garrett Gross et ses collègues d'un rôle cardioprotecteur de l'agoniste delta contre les cardiopathies ischémiques (Mayfield et D'Alecy, 1992; Schultz et Gross, 2001). Une preuve supplémentaire du rôle cardioprotecteur des opioïdes dans le coeur a été fournie par Maslov et al. (Maslov et al., 1996), qui a montré que la stimulation des récepteurs opioïdes delta était anti-arythmique dans le coeur de rat.

D'autres applications thérapeutiques potentielles pour DOPR ont été également rapportées pour les troubles gastro-intestinaux et l'immunomodulation (Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2011).

1.3.4 Les ligands

1.3.4.1 Les ligands delta

Afin d'évaluer les effets physiologiques de l'activation du récepteur opioïde delta, des efforts ont été déployés au cours des deux dernières décennies pour identifier des agonistes et des antagonistes sélectifs de ce récepteur (Tableau 3) (Brunton L, 2010). Des

petits peptides ont fourni des exemples précoces de ligands sélectifs du récepteur delta (Zimmerman et Leander, 1990). Deux limitations importantes liées à l'utilisation des ligands peptidiques sont : une perméabilité limitée de la barrière hémato-encéphalique et une faible biodisponibilité systémique. La plupart des données obtenues avec les ligands peptidiques proviennent d'injections directes dans les ventricules du cerveau (intracérébroventriculaire, icv) ou la colonne vertébrale (intrathécale, i.t.) ou par des études *in vitro* de la fonction du récepteur. Dans le but de contourner les problèmes inhérents à ces peptides, le développement d'agonistes non peptidiques a dû être entrepris. Les petites molécules non peptidiques avec une meilleure stabilité métabolique et des propriétés pharmacocinétiques plus robustes ont été recherchées pour l'expérimentation *in vivo* et le développement clinique d'agents thérapeutiques.

Kwen-Jen Chang et Robert McNutt ont identifié une structure non-peptidique

Type Ligand	Molécules	Récepteur	
		δ	μ
Ligands endogènes	Met-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)	+++	++
	Leu-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)	+++	++
Agonistes sélectifs	DADLE ([D-Ala ² , D-Leu ⁵] enkephalin)	++	
	DPDPE ([D-Pen ² , D-Pen ⁵] enkephalin)	++	
	DSLET ([D-Ser ² , Leu ⁵] enkephalin-Thr ⁶)	++	+
	Deltorphin I (D-Ala ² -Tyr-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH ₂)	+++	
	Deltorphin II (D-Ala ² -Tyr-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂)	+++	
	BUBUC	++	+
	SNC-80	+++	
Antagonistes sélectifs	Naltrindole (NTI)	---	-
	Naltrinben (NTB)	---	-
	7-Benzylidenenaltrexone (BNTX)	---	-

Tableau 3. Agonistes/Antagonistes du récepteur opioïde delta (DOPR).

Les composés en blanc représentent des agonistes peptidergiques et peptidomimétiques delta alors que les molécules en jaune sont non-peptidergiques. Le symbole (+) signifie un agoniste et (-) un antagoniste selon leur affinité pour le récepteur δ et μ. Source : Tableau adapté de Goodman and Gilman's, 10^e Édition-Chapitre 23, p.553.

avec une sélectivité importante pour delta, le BW373U86 (Chang et al., 1993). Ce composé a été montré comme un agent systémique actif et analgésique via sa liaison au DOPR ; ces travaux ont conduit à d'autres études importantes pour l'identification de molécules encore plus sélectives. Cependant, chez les primates et les rongeurs, le BW373U86 ne peut pas induire une antinociception sans produire des effets convulsivants (Dykstra et al., 1993; Negus et al., 1994). Le BW373U86 ou son éther méthylique, le SNC80, ont été des outils précieux pour explorer la pharmacologie des récepteurs opioïdes. L'effet analgésique du BW373U86 semble médier par les récepteurs opioïdes, car le naloxone et le naltrindole produisent le déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse des effets convulsivants (Comer et al., 1993).

Les antagonistes opioïdes non-peptidiques ont joué un rôle crucial comme outils pharmacologiques dans la recherche sur les opiacés. Historiquement, la capacité du naloxone ou du naltrexone d'antagoniser de façon réversible l'effet d'agonistes opioïdiques était et est toujours un critère important pour confirmer l'implication sélective d'un récepteur opioïde à médier son effet. Le naloxone et le naltrexone sont utiles à cet égard parce qu'ils sont des antagonistes universels c'est-à-dire qu'ils ont la capacité de lier les trois récepteurs opioïdes μ , δ , κ . Une avancée majeure dans la recherche d'opiacés delta a été la découverte par Portoghesi de l'antagoniste sélectif du DOPR, le naltrindole, premier ligand non-peptidique pour le récepteur delta (Portoghesi et al., 1988).

Le naltrindole (NTI) a été montré pour être très puissant (Portoghesi et al., 1988). Le naltriben (NTB) et le 7-benzylidenenaltrexone (BNTX) affichent une sélectivité élevée pour les récepteurs opioïdes delta par rapport au NTI (Portoghesi et al., 1992). Le térapeptide Tyr-Tic-Phe-Phe (TIPP) a été introduit plus récemment comme un antagoniste hautement sélectif des récepteurs opioïdes delta (Schiller et al., 1992a; Schiller et al., 1992b).

1.3.4.2 Les ligands endogènes

Trois familles distinctes de peptides opioïdes endogènes ont été identifiées: les endorphines, enképhalines, et dynorphines qui ont une affinité de liaison aux trois

récepteurs opioïdiques (μ, δ, κ). Chaque famille dérive du clivage de trois gènes distincts, leurs précurseurs étant respectivement pro-opiomélanocortine (POMC), proenképhaline (PENK) et prodynorphine (PDYN) (Mansour et al., 1988). PENK a été découvert dans le cortex surrénalien bovin et le cerveau de porc, où la biosynthèse de l'enképhaline a été élucidée (Lewis et al., 1980).

La découverte des peptides enképhalinerigiques endogènes, la leucine-enképhaline (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) et la méthionine-enképhaline (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH) (Hughes et al., 1975), combinée à l'hypothèse qu'il existe trois récepteurs opioïdes (μ, δ et κ), a eu un impact énorme sur la recherche de nouveaux analgésiques opioïdiques qui n'ont peu ou pas de toxicité sévère et d'effets secondaires indésirables associés à la morphine. Les enképhalines, en combinaison avec des antagonistes sélectifs, ont été utiles pour des études de caractérisation. L'analogue [D-Ala², D-Leu⁵] enképhaline (DADLE) a été parmi le premier agoniste delta sélectif, bien qu'il possède également une certaine activité sur les récepteurs opioïdes μ (Pfeiffer et Herz, 1982). Le peptide Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr (DSLET) a également été identifié comme un agoniste delta très sélectif sur la base de ses effets agonistes dans les essais d'iléon de cobaye et du canal déférent de souris (GPI / MVD) (Ward et al., 1982). Ces peptides se sont avérés assez efficaces *in vivo*, mais ils ne sont pas adéquats pour la plupart des types d'études pharmacologiques dues à leur faible sélectivité pour DOPR. Les dérivés de contraintes conformationnelles de la pénicillamine [D-PEN², D-Pen⁵] enképhaline (DPDPE) et [D-PEN², L-Pen⁵] enképhaline (DPLPE) ont été parmi les premiers analogues pour le récepteur delta qui affichaient une haute sélectivité et une grande stabilité *in vivo*. Ces agonistes ont été largement utilisés pour comprendre la pharmacologie et la physiologie des récepteurs opioïdes delta (Mosberg et al., 1983; Akiyama et al., 1985).

La première famille de peptides opiacés provenant d'amphibiens a été découverte en 1981 et nommée dermorphines (Montecucchi et al., 1981). Jusqu'à la découverte des endomorphines de mammifères par Zadina et al. (Zadina et al., 1997), ces peptides représentaient les agonistes les plus puissants et sélectifs des récepteurs μ identifiés

dans les organismes vivants. Huit ans plus tard, les deltorphines ont été découvertes dans la peau des amphibiens par Vittori Erspamer et ses collègues (Erspamer et al., 1989).

Depuis des siècles, les peuples indigènes de l'Amazonie avaient découvert les propriétés pharmacologiques de la peau des amphibiens. Ils avaient l'habitude d'appliquer les sécrétions des peaux séchées de *Phyllomedusa bicolor* sur les blessures des chasseurs. L'abondance de la deltorphine et la dermorphine agissant de concert avec ou sans les autres peptides actifs présents dans ces sécrétions (céruléine, phyllokinin, phyllomedusin, sauvagine, adrenoregulin, et d'autres substances encore inconnues) pourrait avoir causé l'analgésie des chasseurs et provoqué leur comportement d'excitation (Barra et al., 1994). Les agonistes peptidergiques sélectifs pour DOPR, [D-Ala², Asp⁴] deltorphine (deltorphine I) et [D-Ala², Glu⁴] deltorphine (deltorphine II), ont été isolés à partir de la peau de la grenouille *Phyllomedusa bicolor*. Ces composés ont montré une activité antinociceptive via DOPR dans plusieurs modèles de douleur chez les souris et les rats (Foss, 2001). Comme la dermorphine, ces peptides contiennent la D-alanine en second acide aminé, d'où l'appellation D-Ala-deltorphine-I et D-Ala-deltorphine-II

1.3.5 Modulation de la douleur

Actuellement, les analgésiques narcotiques les plus utilisés en clinique agissent par l'intermédiaire des récepteurs opioïdes mu, mais leur utilisation est limitée par leurs effets secondaires néfastes (Narita et al., 2001) décrits au chapitre 1.2.3. Néanmoins, les agonistes DOPR peuvent produire de l'analgésie avec une incidence modérée des symptômes du sevrage, ce qui indique que le récepteur opioïde delta reste une cible thérapeutique importante pour le développement de nouveaux agents analgésiques (Hutcheson et al., 2001). D'ailleurs de nombreux composés sélectifs pour DOPR ont montré une analgésie qui peut être bloquée par des antagonistes sélectifs delta, mais pas par les antagonistes sélectifs mu (Heyman et al., 1987).

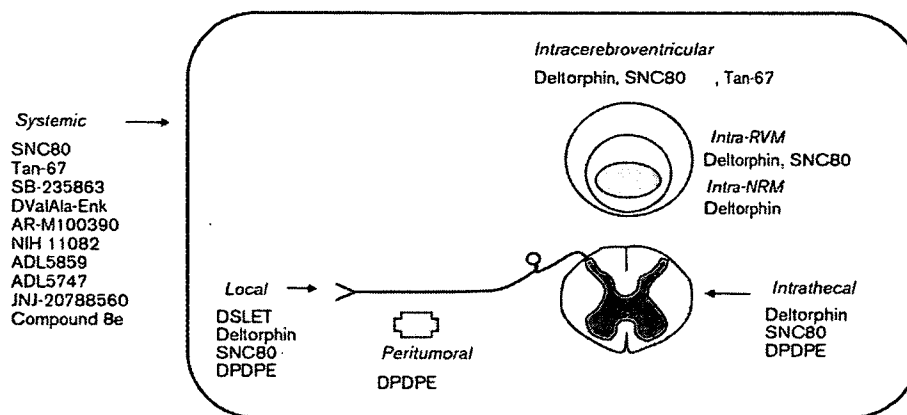


Figure 9. Sites analgésiques des opioïdes delta dans le système nerveux. Ce schéma résume les sites où l'administration des agonistes delta induit de l'analgésie dans des modèles de douleur chronique. La deltorphine a démontré son potentiel analgésique à plusieurs sites différents, systémique, local, intrathécal, intra-medulla rostroventral (intra-RVM), intra-noyau raphé magnus (intra-NRM), intracérébroventriculaire. Source : (Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2011)

1.3.5.1 Effets antinociceptifs de la deltorphine

L'existence de DOPR sur les terminaisons des afférences primaires, dans la moelle épinière et le cerveau, suggère que les agonistes delta agissant sur ces sites seraient d'efficaces composés antinociceptifs (Figure 9) (Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2011).

Administrée en intrathécae chez les rats, la deltorphine II produit une inhibition dose-dépendante de la latence lors du test du retrait de la queue. Son effet inhibiteur dure 10-60 min, en fonction de la dose, et il est réversible par le naltrindole (Improta et Broccardo, 1992). Chez les rats et les singes, il a été démontré que les agonistes opioïdes delta produisent de l'analgésie spinale, même chez les animaux tolérants à la morphine (Yaksh, 1983). De plus, le DPDPE et le DPLPE donnés i.t. produisent de manière dose-dépendante de l'antinociception spinale chez la souris (Porreca et al., 1984). Semblable à l'injection intrathécale, l'infusion dans la moelle épinière de deltorphine II a également produit une analgésie réversible par le NTI et le naloxone chez le rat (Improta et Broccardo, 1992). Dans une étude pharmacologique, il a été constaté que la deltorphine II i.t. était 10 fois plus puissante que le DPDPE dans le test du retrait de la queue chez le rat (Stewart et Hammond, 1993). L'administration spinale d'oligodeoxynucleotides antisens

ciblant DOR-1 peut sélectivement atténuer l'antinociception spinale produite par les agonistes delta, mais pas mu ou kappa, sur les agonistes des récepteurs opioïdes (Narita et Tseng, 1995). De plus, des souris homozygotes déficientes pour DOR-1 montrent une diminution marquée de l'analgésie spinale induite par le traitement avec soit le DPDPE ou la deltorphine (Zhu et al., 1999). Plusieurs études pharmacologiques ont montré également les effets antinociceptifs spinaux des agonistes (Porreca et al., 1984; Stewart et Hammond, 1993; Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2011) via la caractérisation électrophysiologique des effets sur les propriétés des neurones de la corne dorsale, et la détermination neurochimique de leurs effets sur la libération de neurotransmetteurs dans la moelle épinière.

Injectée par voie intracérébroventriculaire (icv) chez le rat, la deltorphine II est un faible agoniste partiel puisque seulement des doses >30 nmol produisent un certain degré d'antinociception dans le test du réflexe de la queue à la chaleur radiante et qu'aucune des doses testées ne permet d'atteindre une réponse maximale (Negri et al., 1995). Chez la souris, deltorphine II montre un effet antinociceptif temps-dépendant à une dose modérée lors de l'administration icv (Jiang et al., 1990). Il a également été montré que la deltorphine II donnée icv était 13 fois plus puissante que le DPDPE et équipotente à la morphine (Vanderah et al., 1994).

Il est reconnu depuis longtemps que l'efficacité analgésique des opioïdes est dynamiquement régulée, avec une puissance accrue dans les états de douleurs inflammatoires et une diminution de la puissance avec l'usage chronique (le phénomène de tolérance). L'augmentation de l'efficacité des opiacés dans des états de douleur inflammatoire semble être en partie médiée par un recrutement en fonction du temps des systèmes opioïdiques supraspinaux. Dans une importante série d'études (Cahill et al., 2001b; Cahill et al., 2003; Morinville et al., 2004b; Gendron et al., 2007a; Beaudry et al., 2009), Cahill, Gendron, Morinville et leurs collègues ont démontré une potentialisation significative de l'action antinociceptive de la deltorphine II injectée par voie spinale dans la moelle épinière suite à une lésion inflammatoire chronique (adjuvant complet de Freund (CFA)) ou un pré-traitement à la morphine. Des études de liaison et

d'autoradiographie ont démontré une forte augmentation des récepteurs opioïdes dans la périphérie chez le rat avec une inflammation induite par le CFA (Kest et al., 1996). Le processus produit par delta semble être un recrutement sur une longue période, et ne se voit pas chez les animaux normaux ou à des temps précoces après une inflammation induite par le CFA (Hurley et Hammond, 2001) ou dans des modèles arthritiques (Kalra et al., 2001). La modulation continue de delta reflète peut-être une libération accrue de ligands endogènes delta dans le tronc cérébral en présence d'inflammation. Une autre possibilité, complémentaire à une augmentation de ligand disponible, est une augmentation de la biodisponibilité de DOPR à la membrane cellulaire, comme cela a été démontrée dans la corne dorsale de la moelle épinière suivant l'inflammation (Cahill et al., 2001b; Cahill et al., 2003; Morinville et al., 2003; Morinville et al., 2004b; Gendron et al., 2006).

La preuve de la plasticité du système opioïdérique delta, en particulier dans les modèles de douleur inflammatoire, suggère que le récepteur delta peut être une cible thérapeutique intéressante dans certains états de douleurs.

Il a été démontré dans plusieurs modèles animaux de lésion du nerf et aussi en clinique chez l'humain, que la morphine atténue peu ou contrôle inadéquatement les comportements de douleur neuropathique ; (Yamamoto T. et Yaksh, 1992; Lee Y. W. et al., 1995; Wegert et al., 1997). L'administration spinale de deltorphine II dans l'intervalle de doses actives produit une réduction de l'hypersensibilité tactile à un stimulus thermique aiguë de façon dose-dépendante et réversible par le naltrindole chez le rat SNL (Nichols et al., 1995). L'injection intrathécale de DPDPE et de deltorphine II chez les rats avec une lésion du nerf sciatique renverse l'hypersensibilité tactile et l'allodynie au froid (Mika et al., 2001). Récemment, un agoniste non-peptidique delta, SB235863, a été actif contre les signes comportementaux de douleur neuropathique (Dondio, 2000).

Les résultats de ces études démontrent l'efficacité des agonistes delta à générer des effets analgésiques potentiels dans un état de douleur neuropathique. L'activation du DOPR semble avoir un impact positif dans le contrôle de la douleur neuropathique dans des modèles pré-cliniques.

de stimuler les canaux K^+ et augmenter le niveau intracellulaire de Ca^{2+} . Plus précisément, les opioïdes diminuent l'entrée d'ions calcium entraînant une diminution de la libération du neurotransmetteur présynaptique (par exemple, la libération de substance P des afférences primaires dans la corne dorsale médullaire). Ils améliorent également l'efflux d'ions de potassium, ce qui entraîne l'hyperpolarisation des neurones post-synaptiques, à son tour qui empêche la propagation des potentiels d'action résultant en une antinociception (Jin et al., 1992; Fukuda et al., 1996). Ainsi, les agonistes des récepteurs opioïdes delta peuvent hyperpolariser le potentiel des membranes et réduire la durée du potentiel d'action dans de nombreux types de neurones ce qui joue un rôle majeur dans l'antinociception produite par les opioïdes delta (Law et al., 1997; Chan et al., 2000).

1.4 LE RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA & LE CANCER DES OS

1.4.1 Études pré-cliniques

À ce jour, les effets des agonistes delta ont peu été étudiés dans les modèles animaux de douleur cancéreuse. Seulement 3 études ont évalué l'effet périphérique et systémique de l'administration d'agonistes delta chez la souris.

Afin de déterminer si l'activation de DOPR périphérique produit de l'analgésie dans un modèle d'ostéosarcome de souris, Baamonde et ses collègues ont mesuré l'hyperalgésie thermique par le test du retrait de la patte suite à l'administration de DPDPE (Baamonde et al., 2005). L'administration péritumorale de DPDPE a atténué de manière dose-dépendante l'hyperalgésie induite par l'ostéosarcome tibial chez la souris. Cet effet a été bloqué par le naltrindole suggérant que la réponse antihyperalgésique observée est sélective pour DOPR. Également, une récente étude a montré l'effet du SNC-80, injecté en sous-cutané, dans un modèle de cancer chez la souris. L'allodynie mécanique générée par le carcinome a été abolie significativement par l'effet du SNC-80 (Ye et al., 2012). Ces études montrent le potentiel analgésique périphérique d'agonistes delta dans des modèles de CIBP mais cependant, il reste à évaluer si la stimulation de DOPR en périphérie peut être suffisante en soi pour soulager la douleur.

Pour examiner les propriétés analgésiques systémiques d'agonistes delta dans le traitement de la douleur due au cancer des os, le groupe de Brainin-Mattos a utilisé un modèle animal d'ostéosarcome du fémur (Brainin-Mattos et al., 2006). Suite à l'induction du cancer dans le fémur, l'animal développe une allodynie tactile, quantifiable, pouvant refléter la douleur incidente. Les résultats obtenus après l'injection intrapéritonéale d'un analogue d'enképhaline ($[DVal^2_L, Ala^5_L]E$) montrent une atténuation dose-dépendante du comportement allodymique observé chez les souris. Ces effets ont été abolis par le naloxone et le naltrindole. Cette étude suggère donc que les agonistes opioïdiques delta délivrés par voie systémique ont un potentiel analgésique contre la douleur cancéreuse dans des modèles précliniques.

1.4.2 Études cliniques

Il existe des études confirmant le pouvoir analgésique d'agonistes delta injectés par la voie intrathécale chez des patients cancéreux tolérants à la morphine.

Le premier cas rapporté est un patient de 74 ans avec un cancer primaire du sacrum métastasé aux poumons. L'augmentation des doses de morphine a été nécessaire, passant de 2-4 mg/jour jusqu'à 60 mg/jour i.t., afin de soulager les douleurs sévères du patient et conséquemment, il a développé de la tolérance à la morphine. Comme alternative, une injection i.t. de DADLE lui a permis de retrouver l'analgésie pendant 48 heures. Par la suite, le traitement s'est poursuivi par une infusion continue de DADLE i.t. (Onofrio et Yaksh, 1983).

Le deuxième cas clinique est relativement similaire au précédent. Un homme de 72 ans souffrant de douleurs osseuses induites par des métastases vertébrales est devenu tolérant à l'utilisation chronique de morphine sulfate. Pour mieux contrôler ses douleurs intenses, il a bénéficié d'injections i.t. de DADLE 230 µg/24h (protocole approuvé par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux, FDA) qui lui a conféré une analgésie complète sur 14 jours (Krames et al., 1986).

La troisième étude comprend 10 patients tolérants aux opioïdes systémiques souffrant de douleur cancéreuse chronique, dont les analgésiques ou leurs combinaisons

avaient été inefficaces pour soulager la douleur incidente et continue des patients. Dans cette étude croisée, les patients ayant reçus du DADLE i.t. ont tous ressentis de l'analgésie. Le soulagement de la douleur a été plus efficace avec le DADLE qu'avec la morphine chez 6 patients (Moulin et al., 1985).

Ces 2 cas et cette étude démontrent la capacité spinale des opioïdes delta à produire une analgésie chez l'homme souffrant de douleur osseuse. Il est donc important de comprendre les mécanismes de cette analgésie en étudiant le rôle de DOPR dans un état de douleur cancéreuse pré-clinique et clinique.

2 OBJECTIFS DU PROJET

Les patients atteints du cancer des os peuvent bénéficier aujourd'hui de meilleures thérapies qui leur permettent maintenant de vivre mieux et plus longtemps. Malheureusement, avec le temps, la qualité de vie est diminuée par la douleur quotidienne grandissante. La douleur osseuse est une dure réalité, surtout en soins palliatifs pour une population vieillissante. Il est difficile de bien contrôler ce type de douleur d'origine complexe et mal comprise. Dans un état de douleur intense et sévère, les patients cancéreux sont généralement soulagés par la morphine et ses analogues, malgré les nombreux effets secondaires engendrés et l'impact sur la fragilité osseuse. Une alternative possible serait l'utilisation d'agonistes agissant sur le DOPR : ils ont montrée des effets analgésiques en études pré-cliniques et ils entraînent peu d'effets secondaires. Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence l'efficacité analgésique de l'agoniste peptidique sélectif delta, la deltorphine II, chez les rongeurs. Injectée par voie intrathécale de manière aiguë, la deltorphine II induit une analgésie dans des modèles de douleur inflammatoire, un effet qui n'est pas soumis au développement de la tolérance analgésique. De plus, certaines observations cliniques indiquent que l'administration intrathécale d'agonistes delta se traduit par une analgésie importante chez des patients tolérants à la morphine et souffrant de douleur due au cancer des os. Ces suggèrent que les agonistes sélectifs delta peuvent représenter une alternative à la morphine pour traiter la douleur cancéreuse chez l'homme.

Objectif général

L'objectif principal du projet était de déterminer, chez le rat, si les agonistes sélectifs delta peuvent représenter une avenue intéressante pour le traitement de la douleur cancéreuse.

- A priori, l'établissement d'un modèle animal de douleur due au cancer des os mimant de près la douleur clinique des patients atteints est l'outil de recherche essentiel pour mener à terme le projet. Grâce à une collaboration avec le laboratoire du professeur Philippe Sarret, il a été possible de créer un modèle animal et d'en faire la caractérisation comportementale et physiopathologique; il s'agit d'un cancer des os

induit dans le fémur de rats. Ces travaux ont mené à une publication où je suis deuxième auteure : Dore-Savard L, Otis V et al. PLoS One, 2010.

- L'objectif suivant a été d'évaluer le potentiel analgésique de l'agoniste sélectif delta, deltorphine II, en utilisant 2 modèles :
 - a) le modèle animal de douleur cancéreuse, comparaison avec
 - b) le modèle d'inflammation induite par le CFA, un modèle bien connu et caractérisé dans la littérature.

3 AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE

Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone pain

Auteurs de l'article : Valérie Otis, Philippe Sarret et Louis Gendron

Statut de l'article : Publié

Neuroscience, Vol 183, p.221-229, 2011

Avant-propos :

J'ai participé, sous la supervision du Pr Louis Gendron, à toutes les étapes de conception de l'article. J'ai réalisé toutes les expérimentations présentées ici, tant la préparation des animaux (chirurgies) que les tests comportementaux. J'ai effectué toutes les analyses de données, le montage des graphiques et j'ai participé à la rédaction de chacune des sections de l'article.

4 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Au cours des dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés pour améliorer le traitement du cancer. De ce fait, la durée de vie des patients cancéreux a augmenté de façon significative. Les patients vivent plus longtemps, mais la douleur associée au cancer des os est un problème majeur affectant leur qualité de vie. Chez les patients souffrants de douleur induite par le cancer des os, la morphine et les AINS sont utilisés en combinaison avec d'autres médicaments pour soulager la douleur. Cependant, ces médicaments ont des effets secondaires qui limitent les doses. La morphine et ses dérivés, couramment utilisés en clinique, sont des agonistes du récepteur opioïde mu (MOPR). Le MOPR est responsable de la plupart des effets secondaires associés aux opioïdes. Dans la présente étude, nous avons démontré la puissance des effets analgésiques d'un agoniste du récepteur opioïdérique delta (DOPR), la deltorphine II, injectée par voie intrathécale, en utilisant un modèle de douleur due au cancer des os récemment mis au point. Suite à l'implantation de cellules mammaires MRMT-1 dans le fémur de rat, nous avons constaté que la deltorphine II diminue de manière dose-dépendante l'allodynie mécanique à 14 jours post-opératoires dans ce modèle. L'effet analgésique observé était médié par DOPR puisqu'il a complètement été bloqué par le naltrindole, un antagoniste sélectif DOPR. En utilisant le modèle inflammatoire induit par l'adjuvant complet de Freund (CFA), nous avons aussi démontré que la deltorphine II est équipotente pour soulager la douleur inflammatoire et cancéreuse (i.e. à des valeurs de ED50 similaires). Somme toute, nos résultats montrent que l'activation spinale de DOPR engendre une analgésie significative à des doses suffisantes pour réduire la douleur inflammatoire. Nos résultats suggèrent que DOPR est une cible potentielle pour le développement de nouvelles thérapies analgésiques, en particulier dans le domaine des douleurs osseuses cancéreuses.

5 ARTICLE

Section: Pain mechanisms

Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone painValérie Otis¹, Philippe Sarret^{1,2} and Louis Gendron^{1,2}¹Département de physiologie et biophysique, ²Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada**Running Title: Intrathecal deltorphin reduces bone cancer pain behaviors**

Corresponding author: Louis Gendron, Ph.D
 Département de physiologie et biophysique
 Faculté de médecine et des sciences de la santé
 Université de Sherbrooke
 3001, 12^{ième} Avenue Nord
 Sherbrooke, Québec
 Canada, J1H 5N4
 Tel: (819) 820-6868, Ext: 12760
 Fax: (819) 820-6887
 Email: Louis.Gendron@USherbrooke.ca

Number of text pages:	34	Number of figures:	4
Number of words in Abstract:	255	Number of tables:	0
Number of words in Introduction:	540	Total number of words:	7156
Number of words in Discussion:	1273	Number of references:	57

Keywords: Delta opioid receptor, bone cancer, MRMT-1 cells, allodynia, complete Freund's adjuvant, pain.

Abstract

Over the past few years, significant progress has been made in cancer therapy. Indeed, the lifespan of cancer patients has significantly increased. Although patients live longer, cancer-related pain remains a daily problem affecting their quality of life, especially when metastases reach the bone. In patients coping with cancer-induced bone pain, morphine and NSAIDs, often used in combination with other medications, are the most commonly used drugs to alleviate pain. However, these drugs have dose-limiting side effects. Morphine and other routinely used opioids are mu opioid receptor (MOPR) agonists. The MOPR is responsible for most opioid-related adverse effects. In the present study, we revealed potent analgesic effects of an intrathecally-administered selective delta opioid receptor (DOPR) agonist, deltorphin II, in a recently developed rat bone cancer model. Indeed, we found that deltorphin II dose-dependently reversed mechanical allodynia 14 days post-surgery in this cancer pain model, which is based on the implantation of mammary MRMT-1 cells in the femur. This effect was DOPR-mediated as it was completely blocked by naltrindole, a selective DOPR antagonist. Using the complete Freund's adjuvant model of inflammatory pain, we further demonstrated that deltorphin II was equipotent at alleviating inflammatory and cancer pain (i.e., similar ED₅₀ values). Altogether, the present results show, for the first time, that activation of spinal DOPRs causes significant analgesia at doses sufficient to reduce inflammatory pain in a rat bone cancer pain model. Our results further suggest that DOPR represents a potential target for the development of novel analgesic therapies to be used in the treatment of cancer-related pain.

Introduction

According to the American Cancer Society, more than 194,000 US patients were diagnosed with breast cancer and 192,000 with prostate cancer in 2009 (Jemal et al., 2009). Advanced breast and prostate cancers often metastasize to the skeleton (Coleman, 1997, 2006). Indeed, bones are among the three most common sites of metastatic diseases (Schulman et Kohles, 2007). Unfortunately, pain is the major debilitating factor in bone metastasis-bearing patients and is responsible for a reduced quality of life (Coleman, 1997; Mercadante, 1997; Mantyh et al., 2002; Zeppetella, 2009).

When tumor cells invade bone, the growing tumors induce nerve compression, ischemia and the release of proinflammatory substances (Honore et Mantyh, 2000). During these changes within the bone, cancer patients commonly experience intermittent periods of severe pain against a background of tonic pain, and these intense pain episodes are further aggravated by the use of the affected limb (movement-evoked pain) (Mercadante, 1997; Urch C., 2004). Although the “World Health Organization analgesic ladder” provides a structured approach to drug selection for the treatment of cancer pain, most medications effective for patients coping with bone cancer pain have dose-limiting side effects (Mercadante, 1997; de Wit et al., 2001; Meuser et al., 2001).

In cancer pain therapy, mu opioid receptor (MOPR) agonists are the most commonly used in a structured approach treatment (Mercadante et Arcuri, 1998; Ruiz-Garcia et Lopez-Briz, 2008). Morphine and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used in combination and have limited efficacy at reducing bone cancer pain (Portenoy et Lesage, 1999; Kirou-Mauro et al., 2009). In fact, although morphine is efficacious at alleviating inflammatory pain, higher doses are usually required to treat cancer-related bone pain (Luger et al., 2002; Wacnik et al., 2003). In some patients, sustained treatment and escalating doses of morphine may be accompanied by analgesic tolerance and/or opioid-induced hyperalgesia (Mercadante et al., 2003; Ossipov et al., 2005; Silverman, 2009) in addition to other common side effects, i.e., constipation, somnolence and sedation (Portenoy et Lesage, 1999).

Currently, advances in cancer therapy have significantly increased the lifespan of patients diagnosed with bone cancer metastasis (Halvorson et al., 2006). However, these patients still suffer from severe episodes of bone-related pain that greatly affect daily activities (Mantyh et al., 2002; Halvorson et al., 2006; Christo et Mazloomdoost, 2008). Therefore, further efforts are required to develop novel therapies to alleviate bone cancer-induced pain over extended periods of time without any adverse side effects.

Early studies have demonstrated that delta opioid receptor (DOPR) agonists produce potent analgesia when administered intrathecally (i.t.) to mice (Porreca et al., 1987). Over the years, the DOPR has emerged as a potential new target for the development of novel painkillers to treat pain arising from different etiologies. Interestingly, in humans coping with cancer pain, i.t.-administered D-Ala-D-Leu-enkephalin (DADLE), a DOPR-preferred agonist, has been shown to produce analgesia (Onofrio et Yaksh, 1983; Moulin et al., 1985; Krames et al., 1986).

Using a newly validated preclinical model that closely mimics the human conditions of metastatic breast cancer-induced bone pain (Dore-Savard et al., 2010), we examined the analgesic properties of i.t. deltorphin II, a DOPR-selective agonist, to treat cancer-induced bone pain. For comparison, the analgesic potency of i.t. deltorphin II in cancer pain was also determined in the well-characterized complete Freund's adjuvant (CFA) model of chronic inflammatory pain.

Experimental procedures

Cell Culture

Mammary rat metastasis tumor (MRMT-1) cells were provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University 4-1, Seiryō, Aoba-ku, Sendai, Japan). These cells originated from female Sprague-Dawley rats. Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Montreal, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, heat-inactivated) and 2% penicillin/streptavidin (Gibco, Montreal, Qc, Canada). Cells were detached using a gentle mechanical medium-flow and then prepared for implantation. Briefly, cells were pelleted by centrifugation (3 min at 200 X g), rinsed with 1 mL of Hank's balanced salt solution without calcium, magnesium or phenol (HBSS; Gibco, Montreal, Qc, Canada) and then centrifuged again (3 min at 200 X g). The pellet was re-suspended in 1 mL of RPMI 1640, and cells were counted using a hemacytometer. For injection, cells were diluted to achieve a final concentration of 30,000 cells in 20 μ L of RPMI 1640 medium and were maintained on ice prior to surgery. For the sham group, 20 μ L of RPMI 1640 was injected into the femur.

Animals

Two adult male Sprague-Dawley rats (175-225 g; Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were housed per cage and maintained on a 12 hour light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke (protocol #170-07) and carried out according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) to refine and reduce the number of animals used and ensure humane endpoints. Behavioral studies were conducted between 6:00 and 11:00 (light cycle). Rats were acclimated for 4 days to the animal facility and 3 days to manipulations and devices prior to behavioral studies.

Surgery

Animals' anesthesia was induced with 5% isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, Qc, Canada) and then maintained with 2.5% isoflurane with an O₂ flow of 1

L/min during the surgery. Throughout the surgery, the eyes were protected with an ophthalmic liquid gel (Tear-gel, Novartis, Mississauga, ON). Next, animals were laid supine, and their left hind paw was shaved and disinfected with 70% v/v ethanol and 10% v/v povidone-iodine (Rougier Pharma, Mirabel, Qc, Canada). A minimal skin incision (8-10 mm) exposed the *quadriceps femoris*. To reach the femoral condyles, the *vastus lateralis* was incised (5-8 mm in length), and the patellar ligament was moved adjacent to the medial condyle to expose the patellofemoral groove area. Minimal damage was inflicted to the surrounding muscles and blood vessels. With this procedure, knee ligaments remained intact. Using a 25-gauge needle, a small and superficial cavity was bored between the medial and lateral condyle (approximately 1 mm in depth). A 25-gauge needle was inserted into the cavity at a 45° angle allowing it to reach the intramedullar canal of the femur. The needle was then substituted with a blunt-ended 25-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe containing 20 µL of the cell suspension (30,000 cells). The syringe was left in place for 1 min to allow the cell suspension to disperse into the bone marrow. The needle was then removed, and the cavity was sealed using dental amalgam (Prodigy A3, Kerr, Orange, CA) and polymerized with a curing light (QHL75, Sinclair Dental, Montreal, Canada). The site was thoroughly washed with sterile saline solution. The muscle and the connective tissue were closed using a discontinuous suture made with a synthetic absorbable suture (Monocryl, Ethicon, Sommerville, NJ). The skin was closed using a continuous suture made with a non-absorbable surgical suture (Prolene, Ethicon, Sommerville, NJ). Finally, the wound was washed with 3% v/v peroxide and sprayed with a bitter solution (Aventix animal health, Flamborough, ON). After the surgery, animals recovered from anesthesia within 3 minutes and could walk easily on their operated-limb immediately following surgery.

Imaging

Femurs were gently dissected to preserve their unique pathological condition. To preserve the architecture, rat femurs were immersed in 70 % ethanol for a minimum of 72 hours. Radiographs of dissected bones from sarcoma- and sham-operated animals 14 days after surgery were performed using a Faxitron MX-20 (Faxitron, Lincolnshire, IL).

Pictures were taken at 26 kV with an exposure time of 10 s and at 2X magnification. Micro-computed tomography analyses were performed on the same samples with a 1072 MicroCT system (Skyscan, Kontich, Belgium). The parameters were as follows: source: 80 kV, 124 μ A; zoom: 20X; pixel size: 14.06 μ m; exposition time: 3.0 s; rotation: 0.9°.

Induction of Inflammation

Unilateral inflammation of the hind limb was induced by a single subcutaneous injection of 100 μ L emulsified complete Freund's adjuvant (CFA 200 μ g/100 μ L; Calbiochem, San Diego, CA, USA) into the plantar surface of the left hind paw of rats under brief isoflurane anesthesia (3%; 1 L/min). Behavioral testing was carried out 6 days after CFA injection. The level of edema was measured by water displacement with a Plethysmometer (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA).

Drugs

Deltorphan II (lot #077K14561; Sigma, St. Louis, MO, USA, batch no 5/20720; Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA, and lot #M08048T1; American Peptide, Sunnyvale, CA, USA) was dissolved in sterile saline solution (0.9% NaCl) to a concentration of 1 mg/mL and stored at -20°C in aliquots until use. For behavioral testing, deltorphan II was diluted in sterile saline and injected i.t. Briefly, deltorphan II or vehicle saline were gently administered (in 30 μ L final volume over 2 s) into the L4-L5 intervertebral space (corresponding to the *cauda equina*) using a 26G ½-inch needle mounted on a Luer tip Hamilton syringe (VWR, Montreal, Qc, Canada) under light isoflurane anesthesia (3%; 1 L/min). Needle placement was confirmed by the observation of a light tail flick. Selectivity of deltorphan II for the DOPR was verified by blocking DOPR binding sites with the selective DOPR antagonist, naltrindole (72 μ g in final volume 30 μ L; batch no 10A/93089; Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), injected 10 min prior to deltorphan II. The putative effect of the same dose of naltrindole alone was also evaluated.

Behavioral testing

von Frey hair test. Sensitivity to non-noxious mechanical stimuli was measured using the von Frey test. To detect the appearance of allodynia, bilateral hind paw

withdrawal responses to von Frey hair stimulation of the plantar surface of the footpads were determined at postoperative days 3, 7, 11 and 14. Animals were acclimated to a transparent plastic box with a wire mesh floor (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) for 30 min, during the 3 consecutive days prior to the first test (on day 3). A 15 min habituation period was allowed before all other testing days (day 7, 11 and 14). The mid-plantar surface of the left hind paw was stimulated using a series of 8 Touch Test[®] von Frey hairs with logarithmically incremental stiffness capable of exerting bending forces of 0.41, 0.70, 1.20, 2.0, 3.63, 5.50, 8.50 and 15.10 g (Stoelting). The force of stimulation that caused rapid withdrawal in 50% of trials was calculated using the up-and-down Dixon method (Dixon, 1980, 1991). Tests started with a 2.0 g filament and each filament was held for 10 s. An absence of response led to a stronger subsequent stimulus, while the next weaker hair was used following a paw withdrawal event. According to the Dixon method, threshold calculation requires 6 responses in the immediate vicinity of the 50% threshold. In cases where continuous positive or negative responses were obtained from the entire range of hair stimuli, values of 15.00 g and 0.25 g were assigned, respectively. The resulting pattern of positive and negative responses was tabulated using the convention X = withdrawal and O = no withdrawal, and the 50% response threshold was interpolated using the formula: 50% g threshold = $(10^{[X_f + \kappa\delta]})/10,000$ where X_f = value (in log units) of the final von Frey hair used; κ = tabular value (Appendix from (Chaplan et al., 1994)) for the positive/negative responses; and δ = mean difference (in log units) between stimuli (here $\delta = 0.175$).

Testing timeline. MRMT-1 cells were implanted into the femur, or CFA was injected into the left hind paw, as described above. Fourteen and 6 days after cancer-induction and CFA injection, respectively, the 50% paw withdrawal threshold (indicated as 0 min) was measured prior to i.t. injection of saline, deltorphin II or naltrindole. Thereafter, the 50% withdrawal threshold was measured every 15 min over a 60 min period. The maximum possible effects (MPE) of deltorphin II in the presence or absence of naltrindole in cancer animals and CFA-injected rats were calculated according to the following formula: %MPE = $100 \times [(\text{test 50\% paw withdrawal threshold}) - (\text{baseline 50\% paw withdrawal threshold})] / [(\text{cutoff value, i.e., 15 g}) - (\text{baseline 50\% paw withdrawal threshold})]$

threshold)]. From the latter calculation, 0% MPE represents no anti-allodynic effect of the drug while a 100% MPE corresponds to a complete relief of the mechanical allodynia or hypersensitivity, i.e., response withdrawal thresholds to von Frey hair equal to baseline values (prior to cancer cells or CFA injection).

Calculations and statistical analysis

Calculations were done using Excel 2007, graphs using SigmaPlot 11.0, and statistical analysis using GraphPad Prism 5.0. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.).

Results

General observations

Sarcoma and sham animals were frequently weighed throughout the duration of the experiments. On day 14, no difference in weight was observed between cancer- (331.2±8.9 g; n=13) and sham-operated rats (332.5±7.3 g; n=8). At that time, sarcoma rats frequently displayed limping and guarding and avoided bearing body weight on their sarcoma paw, suggesting the presence of cancer-induced continuous and movement-evoked pain. Such behaviors were not observed in sham-operated animals.

Bone cancer induced mechanical allodynia

As shown in Fig. 1A, implantation of 30,000 MRMT-1 cells into the femur of Sprague-Dawley rats resulted in the development of mechanical allodynia. Seven days following tumor cell injection, the ipsilateral paw of tumor-bearing rats showed decreased withdrawal threshold to von Frey hair stimuli compared to the contralateral paw (50% withdrawal threshold = 7.45±1.15 g and 13.37±0.80 g for ipsi- and contralateral hind paw, respectively; *** P<0.001, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Over the course of the experiment, the 50% paw withdrawal threshold of cancer-bearing rats progressively decreased reaching 5.51±0.95 g on day 11 and 4.29±0.62 g on day 14 post-surgery (*** P<0.001 compared to contralateral hind paw, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). These data suggest that cancer-bearing rats have developed mechanical allodynia simultaneously with tumor progression (Fig. 1A). The 50% withdrawal threshold for the ipsilateral hind paw was not changed over time in sham-operated rats (Fig. 1A).

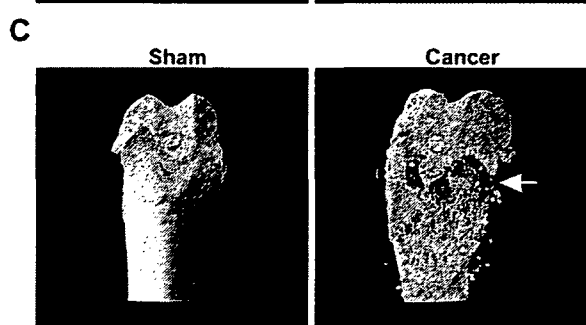
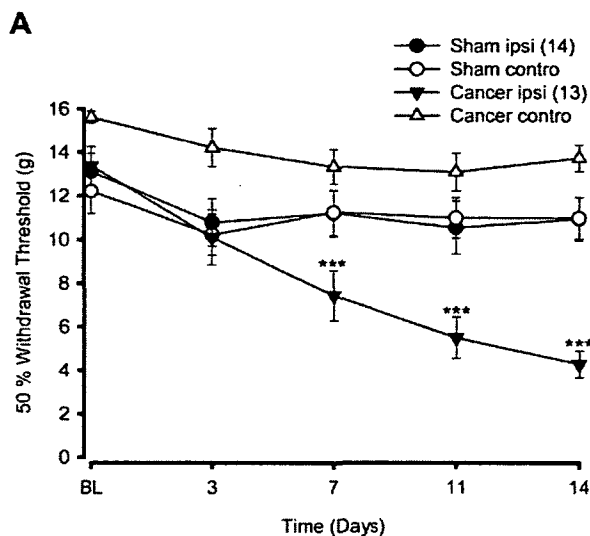


Figure 1. Mechanical allodynia and femur remodeling following implantation of MRMT-1 cells. (A) Allodynia was evaluated using the manual von Frey hairs in cancer and sham-operated rats. In tumor-bearing rats, the 50% paw withdrawal threshold was significantly diminished by 7 days following tumor cell implantation (***) $P < 0.001$ when compared to paw withdrawal threshold of the contralateral hind paw of cancer rats; two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). The contralateral hind paw of cancer-bearing rats remained similar to both hind paws of sham animals at day 7, 11 and 14 but was slightly decreased on day 3 (* $P < 0.05$ when comparing cancer contralateral to sham contralateral hind paw; two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Numbers in parentheses indicate the number of animals per group. **(B)** Faxitron radiographs of sham and cancer rats at 14 days post-surgery. In cancer-bearing femurs, cortical bone integrity is strongly compromised (white arrows) compared to sham-operated femurs. **(C)** Microcomputed tomodensitometry of sham-operated and cancer-bearing rat femurs. Fourteen days after surgery, sham femur showed an intact structure, whereas the bone integrity of a sarcoma femur is seriously compromised showing marked signs of potential fracture (white arrows).

Tumor progression induced bone loss and fragility

We have recently reported that proliferation of MRMT-1 cells into the femur induces structural bone remodeling and bone loss (Dore-Savard et al., 2010). In the present study, mechanical allodynia was accompanied by enhanced bone fragility 14 days post-surgery. Whole femur X-rays (Fig. 1B) and tomodensitometry of the distal femur (Fig. 1C) from tumor-bearing animals revealed structural changes when compared to sham animals. Indeed, in the cancer-bearing femur, severe cortical bone loss was observed at the distal level (white arrow; Fig. 1B and 1C).

DOPR activation reversed bone cancer-induced mechanical allodynia

To investigate the possible role of DOPRs in alleviating cancer-induced mechanical allodynia, increasing doses of deltorphin II were injected i.t. 14 days after MRMT-1 cell implantation. As shown in Fig. 2A, i.t. deltorphin II (3-30 μ g) time- and dose-dependently increased the 50% paw withdrawal threshold. The peak response was observed 15 min after administration of 3 μ g (5.33 ± 0.93 g) and 10 μ g (7.97 ± 1.70 g) of deltorphin II. When a 30 μ g bolus was administered, the maximal effect of deltorphin II was maintained from 15 to 30 min after the injection (13.29 ± 1.60 g for 15 min and 12.93 ± 1.36 g for 30 min). Responses returned to baseline values 45 minutes after injection for all doses (Fig. 2A). To determine whether the anti-allodynic effect of deltorphin II was DOPR-mediated, naltrindole was injected i.t. 10 min prior to deltorphin II. As illustrated in Fig. 2A, a 3:1 molar ratio of naltrindole (72 μ g) completely abolished the analgesic effect of deltorphin II (30 μ g). In the presence of naltrindole, deltorphin II failed to produce anti-allodynia (50% paw withdrawal threshold = 3.31 ± 0.42 g at 15 min and 4.11 ± 0.42 g at 30 min post deltorphin II; *** $P < 0.001$ compared with deltorphin II alone). The %MPE of 30 μ g deltorphin II in the presence or absence of 72 μ g naltrindole are shown in Fig. 2B. In naltrindole-treated animals, deltorphin II was unable to exert analgesic effects at either 15 (%MPE = $-7.3 \pm 6.6\%$ compared to $87.7 \pm 12.0\%$ for deltorphin II alone) or 30 min after administration (%MPE = $-2.9 \pm 5.2\%$ compared to $89.0 \pm 7.5\%$ for deltorphin II alone). As shown in Fig. 2C, i.t. injection of naltrindole alone had no effect.

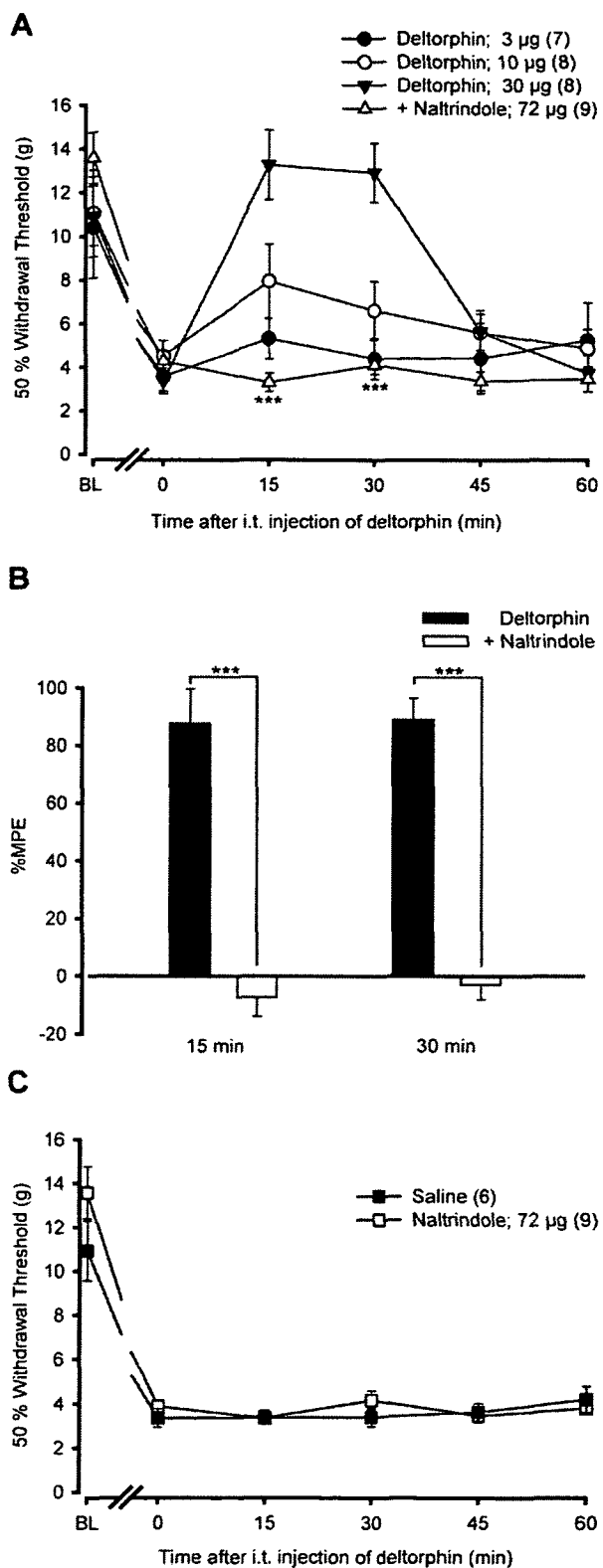


Figure 2. Anti-allodynic effects of i.t. deltorphin II in cancer rats. (A) Mechanical thresholds were measured using von Frey filaments before (BL) and 14 days after MRMT-1 cell implantation. The paw withdrawal threshold (in g) was measured every 15 min (from 15 to 60 min) following i.t. injection of deltorphin II. Time 0 indicates the latency to paw withdrawal before i.t. injection of deltorphin II. Intrathecally-administered deltorphin II induced a dose-dependent (3, 10, 30 µg) reduction in mechanical allodynia in the ipsilateral hind paw ($F_{\text{Treatment}}=6.50$ with $P=0.002$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). The anti-allodynia of deltorphin II peaked 15 min after the injection. Intrathecally-administered naltrindole (NTI), 10 min before deltorphin II (Delt II) injection (a 3:1 molar ratio of NTI/ Delt II = 72/30 µg), antagonized deltorphin II anti-allodynic effects at both 15 and 30 min post-injection ($F_{\text{Treatment}}=32.15$ with $*** P<0.001$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). (B) %MPE \pm S.E.M. were determined 15 and 30 min after injection of deltorphin II \pm NTI. Percentage MPE of deltorphin II administered after NTI are significantly different from %MPE in deltorphin II-treated rats, indicating that the effect of deltorphin II was DOPR-mediated ($*** P<0.001$, two-tailed unpaired *t*-test). (C) As compared with saline, by itself i.t. NTI (72 µg) has no effect on the cancer-induced mechanical allodynia ($F_{\text{Treatment}}=0.38$ with $P>0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test)

DOPR activation reduced CFA-induced tactile hypersensitivity

It has been shown that morphine is less efficacious at alleviating bone cancer pain than inflammatory pain (Luger et al., 2002; Wacnik et al., 2003). To compare the analgesic efficacy of deltorphin II in these pain models, we measured the anti-allodynia in the CFA model of inflammation. Injection of 100 μ L of CFA emulsion into the plantar surface of the left hind paw rapidly induced the development of edema and swelling. We determined that 6 days after CFA injection, the level of mechanical allodynia was comparable to tumor-bearing animals at 14 days post-MRMT-1 cell implantation (see Fig. 1A). Six days after the CFA injection, the ipsilateral hind paw volume (i.e., edema) was 2.52 ± 0.07 mL compared to 1.65 ± 0.03 mL for the contralateral hind paw (***) $P < 0.0001$ when compared to contralateral hind paw; Student's two-tailed paired *t*-test). As shown in Fig. 3A, i.t. deltorphin II dose-dependently (3-30 μ g) decreased CFA-induced allodynia. While there was no difference observed following 3 μ g of deltorphin II (50% paw withdrawal threshold = 2.98 ± 0.40 g), the analgesic effect using 10 μ g and 30 μ g peaked 15 min after deltorphin II administration (50% paw withdrawal threshold = 8.70 ± 1.71 g and 11.09 ± 1.65 g, respectively). Paw withdrawal thresholds returned to baseline 45 min after deltorphin II injection. The anti-allodynic effect of 30 μ g deltorphin II was DOPR-mediated because i.t. naltrindole (72 μ g) injection 10 min prior to deltorphin II administration significantly reduced deltorphin II-mediated analgesia (Fig. 3A; 50% paw withdrawal threshold = 4.33 ± 0.38 g at 15 min and 2.73 ± 0.22 g at 30 min post deltorphin II; *** $P < 0.001$ compared with deltorphin II 30 μ g). In the presence of naltrindole, the %MPE of deltorphin II was $12.8 \pm 3.3\%$ and $-0.7 \pm 4.6\%$ after 15 and 30 min, respectively, whereas it reached $60.5 \pm 16.7\%$ and $41.5 \pm 17.7\%$ for deltorphin II alone (Fig. 3B; * $P < 0.05$ for naltrindole compared to deltorphin alone, two-tailed unpaired *t*-test). As shown in Fig. 3C, i.t. injection of naltrindole had no effect by itself.

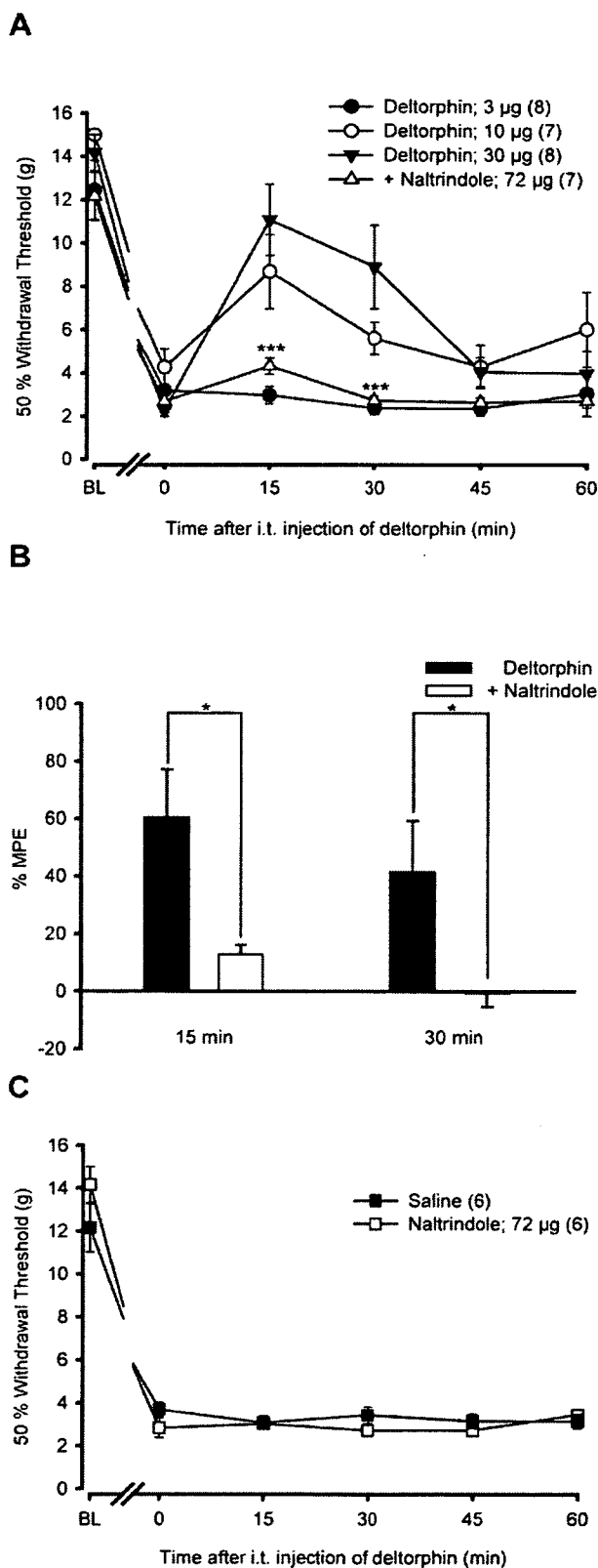


Figure 3. Anti-allodynic effects of i.t. deltorhin II in CFA rats. (A) Rats were injected with CFA in the plantar surface of the left hind paw. Six days after CFA injection, the 50% paw withdrawal threshold (in g) was measured using von Frey hairs every 15 min over a period of 60 min following i.t. injection of deltorhin II (Delt II; 3, 10, 30 µg) alone or following naltrindole (NTI; 72 µg) injection. BL indicates the baseline for 50% withdrawal threshold just before CFA injection, and time 0 indicates the paw withdrawal threshold immediately before deltorhin II injection. Intrathecally-administered deltorhin II induced a dose-dependent (3, 10, 30 µg) reduction of mechanical allodynia of the ipsilateral hind paw of CFA-treated rats ($F_{\text{Treatment}}=15.83$ with $P<0.0001$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). The anti-allodynia induced by deltorhin II peaked 15 min after the injection. Intrathecally-administered naltrindole, 10 min prior to deltorhin II injection (a 3:1 molar ratio of NTI/ Delt II = 72/30 µg), reversed the anti-allodynia induced by deltorhin II at 15 min post-injection ($F_{\text{Treatment}}=25.53$ with $P<0.0001$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). (B) The %MPE \pm S.E.M. was determined 15 and 30 min after injection of deltorhin II alone or in combination with NTI. The %MPE for deltorhin II injected after NTI was lower than the %MPE of deltorhin II-injected rats, indicating that the effect of deltorhin II was DOPR-mediated (* $P<0.05$ at 30 min, two-tailed unpaired *t*-test). (C) As compared with saline, by itself i.t. NTI (72 µg) has no effect on the CFA-induced mechanical allodynia ($F_{\text{Treatment}}=3.13$ with $P>0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test).

Deltorphan II has equal potency at alleviating bone cancer pain and inflammatory pain

We determined the potency of deltorphan II to inhibit bone cancer pain and inflammatory pain. As shown in Fig. 4, doses of deltorphan II required to induce 50% of the maximal possible effect (ED_{50}) at 15 min are 10.1 μg and 17.6 μg for cancer-bearing and CFA animals, respectively. Note that the %MPE used for this calculation were determined from the results shown in Fig. 2B and Fig. 3B. The relative potency of deltorphan II at alleviating bone cancer pain and inflammatory pain were comparable ($P > 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

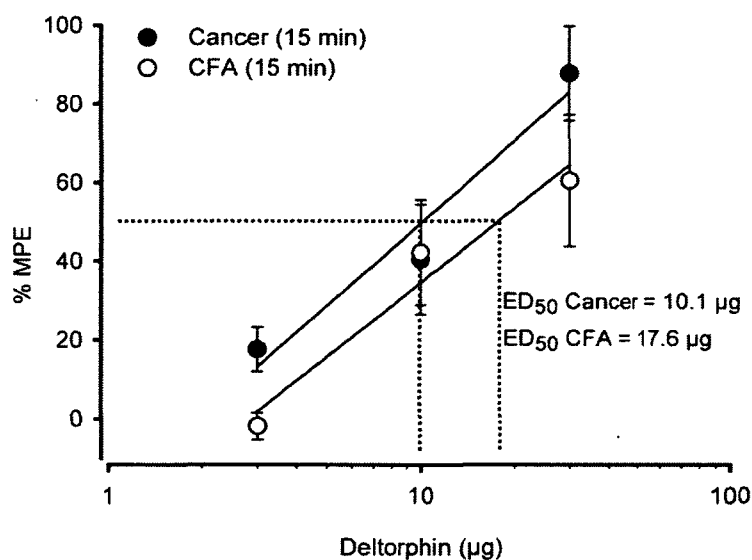


Figure 4. Analgesic efficacy of deltorphan II in bone cancer pain and inflammatory pain. A graph of the effective dose of deltorphan II (ED_{50}) inducing 50% relief of the mechanical allodynia and hypersensitivity was obtained from the data presented in Fig. 2B and 3B at the corresponding peak responses (i.e., 15 min after i.t. injection of deltorphan II). No difference was observed between cancer ($ED_{50}=10.1 \mu\text{g}$) and CFA-treated rats ($ED_{50}=17.6 \mu\text{g}$) (Statistical analysis was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test).

Discussion

In this study, we investigated the analgesic potency of deltorphin II in a rat bone cancer pain model 14 days after MRMT-1 cancer cell implantation in the femur. Our results demonstrated that i.t. deltorphin II, a selective DOPR agonist, alleviates bone cancer-induced mechanical allodynia. Interestingly, we also observed that i.t. deltorphin II is equally efficacious at reducing bone cancer pain and complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain.

Bone cancer pain is among the most difficult types of pain to treat (Honore et al., 2000b; Kirou-Mauro et al., 2009). Although morphine and other MOPR agonists are the most common treatment of cancer pain, they are ineffective in a large proportion of patients (Portenoy et Lesage, 1999; Kirou-Mauro et al., 2009). For this reason, it is common that increasing doses of morphine are required to adequately reduce bone cancer pain, a strategy often accompanied by unwanted side effects (Portenoy et Lesage, 1999; Mercadante et al., 2003; Ossipov et al., 2005; Silverman, 2009). More alarmingly, prolonged morphine treatment has been shown to accelerate bone degradation and fragility and sarcoma-induced bone pain (King et al., 2007).

Recently, DOPRs became an attractive target to develop new therapies for the treatment of chronic and severe pain. In fact, drugs selectively acting on DOPR could represent an interesting alternative to MOPR drugs for the treatment of diverse types of pain. We and others have reported that spinally-administered DOPR agonists have potent analgesic effects in preclinical animal models of inflammatory (Stewart et Hammond, 1994; Fraser et al., 2000b; Hurley et Hammond, 2000; Cahill et al., 2003; Petrillo et al., 2003a; Morinville et al., 2004b; Gendron et al., 2007a; Gendron et al., 2007b) and neuropathic pain (Mika et al., 2001; Petrillo et al., 2003a; Holdridge et Cahill, 2007). Bone cancer-induced pain is, however, a distinct and more complex type of pain. Although bone cancer pain shares common characteristics with both neuropathic and inflammatory pain, Honore and colleagues have suggested that bone cancer pain

generates a unique set of neurochemical changes in both dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord (Honore et al., 2000b).

The present study investigated the role of spinal DOPRs in the treatment of pain induced by bone cancer. Using a rat model of cancer-induced bone pain characterized in our laboratory (Dore-Savard et al., 2010), we first measured the onset of mechanical allodynia following MRMT-1 cell injection in the femur. We observed that mechanical allodynia rapidly and progressively developed from day 7 to day 14 following tumor cell implantation. At day 14, mechanical allodynia was shown to be associated with bone structural changes, degradation, and microfractures. Additionally, MRMT-1 cells increased osteoclast activity leading to progressive bone remodeling, as demonstrated previously (Dore-Savard et al., 2010). These observations are consistent with studies performed in other rat and mouse models of bone cancer pain (Medhurst et al., 2002; Donovan-Rodriguez et al., 2004; Brainin-Mattos et al., 2006; King et al., 2007).

The analgesic potency of i.t.-delivered deltorphin II, a selective DOPR agonist, was thus measured 14 days after tumor cell implantation. In tumor-bearing rats, i.t. deltorphin II produced significant dose-dependent anti-allodynic effects. This effect was DOPR-mediated because it was prevented by naltrindole, a DOPR-selective antagonist. In mouse models of tibial (Baamonde et al., 2005) and femoral osteosarcoma (Brainin-Mattos et al., 2006), peripheral (local or systemic) administration of DOPR agonists produced analgesia. This is however the first study demonstrating that i.t.-delivered DOPR agonist can adequately alleviate bone cancer-induced pain in rodents. Accordingly, in humans coping with cancer-induced pain, i.t. DADLE, a DOPR-preferred agonist, was also found to induce potent analgesia (Onofrio et Yaksh, 1983; Moulin et al., 1985; Krames et al., 1986). In most patients, DADLE was as potent as morphine in alleviating bone cancer pain (Moulin et al., 1985). More importantly, DADLE remained active in patients tolerant to systemic (Moulin et al., 1985) or i.t. opiates (Krames et al., 1986). In the present study, we only evaluated mechanical hypersensitivity. Additional studies will be necessary to determine whether spinally-injected DOPR agonists are

effective at reducing movement-evoked pain and spontaneous pain, two modalities often present in patients with cancer pain.

Because morphine was previously shown to have reduced potency in alleviating bone cancer pain compared to inflammatory pain (Luger et al., 2002; Wacnik et al., 2003), we sought to determine the analgesic effects of i.t. deltorphin II in these two pain models. At comparable levels of mechanical allodynia for each model, we found that deltorphin II had a similar relative potency at alleviating bone cancer- and inflammation-induced pain. These observations contrast with morphine's apparent four- to ten-fold lower potency against tumor-induced bone pain (Luger et al., 2002; Wacnik et al., 2003) and further support the utility of using DOPR selective agonists to treat this type of pain. The reduced efficiency of morphine in animals suffering from bone cancer pain could possibly be explained by the down-regulation of MOPR in a distinct population of DRG neurons (Yamamoto J. et al., 2008). Similarly, humans suffering from bone cancer pain generally need higher doses of morphine compared to individuals coping with inflammatory pain (Mercadante et Arcuri, 1998; Mercadante, 2010). Therefore, it is interesting that a spinal DOPR agonist produced similar analgesia in both pain models. Because morphine only has a narrow selectivity for MOPR and DOPR, it could be hypothesized that the high doses of morphine required to alleviating pain in bone cancer pain patients might also activate DOPR in addition to MOPR.

In a rodent CFA model, we have previously demonstrated that the increased DOPR agonist efficiency was accompanied by an up-regulation of DOPRs at the cell surface of DRG and spinal cord neurons (Cahill et al., 2003; Gendron et al., 2006; Gendron et al., 2007a). The same phenomenon was also observed in neuropathic pain models (Morinville et al., 2004a). Currently, it is not known if the levels of membrane-associated DOPRs in neurons are increased following injection of tumor cells in the femur. However, because the doses of deltorphin II used in this study had no effect in the contralateral paw, this suggests that DOPRs are activated poorly in the absence of pain and therefore, supports the hypothesis that its membrane expression is enhanced following tumor-induced bone pain. It was shown previously that DOPR deletion in mice

induced exaggerated responses to noxious stimuli (Martin M. et al., 2003) and increased neuropathic and inflammatory pain in corresponding animal models (Nadal et al., 2006; Gaveriaux-Ruff et al., 2008). In the present study, acute pharmacological blockade of DOPR had no effect on the allodynia induced by bone cancer pain and by inflammation, suggesting that if these pain conditions changed the properties of DOPR, naltrindole administration had no hyperalgesic effect.

In addition to the analgesia induced by DOPR agonists (present study and (Baamonde et al., 2005; Brainin-Mattos et al., 2006), activation of DOPRs was shown to reduce cancer cell invasion and proliferation (Martin-Kleiner et al., 2003; Jaglowski et al., 2005; Debruyne et al., 2010; Kuniyasu et al., 2010). In the present study, only acute i.t. administration of deltorphin II was performed. Therefore, it is possible that sustained systemic infusion of a DOPR agonist could decrease MRMT-1 cell proliferation and invasion.

Conclusion

In conclusion, we demonstrated for the first time in a rat bone cancer pain model the analgesic effects of a spinally-administered selective DOPR agonist, deltorphin II. In particular, we showed the dose-dependent anti-allodynic effects of deltorphin II in sarcoma-induced bone cancer and inflammatory pain. In both models, we found similar analgesic potency of deltorphin II. Bone pain symptoms are generated by various mechanisms that remain unclear. A better understanding of the mechanisms underlying bone cancer pain and the regulation of DOPRs in chronic pain conditions will be important in the development of DOPR-targeted medications.

Acknowledgements

The authors are thankful to Karine Belleville who provided technical help and advice on the bone cancer model. This work was primarily supported by grant MOP-84538 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to LG, but also by grant MOP-106574 from the CIHR awarded to P.S and L.G and by a grant from the Cancer Research Society (CRS) awarded to PS. LG is the recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Junior 1 salary support, and PS is a CIHR Young Investigator.

References

- Baamonde A, Lastra A, Juarez L, Garcia V, Hidalgo A, Menendez L (2005), Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:213-219.
- Brainin-Mattos J, Smith ND, Malkmus S, Rew Y, Goodman M, Taulane J, Yaksh TL (2006), Cancer-related bone pain is attenuated by a systemically available delta-opioid receptor agonist. *Pain* 122:174-181.
- Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, Beaudet A (2003), Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 101:199-208.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994), Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Christo PJ, Mazloomdoost D (2008), Cancer pain and analgesia. *Ann N Y Acad Sci* 1138:278-298.
- Coleman RE (1997), Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80:1588-1594.
- Coleman RE (2006), Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12:6243s-6249s.
- de Wit R, van Dam F, Litjens MJ, Abu-Saad HH (2001), Assessment of pain cognitions in cancer patients with chronic pain. *J Pain Symptom Manage* 22:911-924.
- Debruyne D, Leroy A, O DEW, Vakaet L, Mareel M, Bracke M (2010), Direct effects of delta opioid receptor agonists on invasion-associated activities of HCT-8/E11 colon cancer cells. *Anticancer Res* 30:9-17.
- Dixon WJ (1980), Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441-462.
- Dixon WJ (1991), Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev* 15:47-50.
- 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.
- Dore-Savard L, Otis V, Belleville K, Lemire M, Archambault M, Tremblay L, Beaudoin JF, Beaudet N, Lecomte R, Lepage M, Gendron L, Sarret P (2010), Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS One* 5:e13774.
- Fraser GL, Pradhan AA, Clarke PB, Wahlestedt C (2000), Supraspinal antinociceptive response to [D-Pen(2,5)]-enkephalin (DPDPE) is pharmacologically distinct from that to other delta-agonists in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1135-1141.
- Gaveriaux-Ruff C, Karchewski LA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL (2008), Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci* 27:2558-2567.
- Gendron L, Esdaile MJ, Mennicken F, Pan H, O'Donnell D, Vincent JP, Devi LA, Cahill CM, Stroh T, Beaudet A (2007a), Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience* 144:263-274.

- Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, O'Donnell D, Vincent JP, Stroh T, Beaudet A (2006), Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 26:953-962.
- Gendron L, Pintar JE, Chavkin C (2007b), Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* 150:807-817.
- 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.
- Holdridge SV, Cahill CM (2007), Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain* 11:685-693.
- Honore P, Mantyh PW (2000), Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain Med* 1:303-309.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW (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.
- Hurley RW, Hammond DL (2000), The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci* 20:1249-1259.
- Jaglowski JR, Zagon IS, Stack BC, Jr., Verderame MF, Leure-duPree AE, Manning JD, McLaughlin PJ (2005), Opioid growth factor enhances tumor growth inhibition and increases the survival of paclitaxel-treated mice with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:97-104.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009), Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
- King T, Vardanyan A, Majuta L, Melemedjian O, Nagle R, Cress AE, Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2007), Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. *Pain* 132:154-168.
- Kirou-Mauro AM, Hird A, Wong J, Sinclair E, Barnes EA, Tsao M, Danjoux C, Chow E (2009), Has pain management in cancer patients with bone metastases improved? A seven-year review at an outpatient palliative radiotherapy clinic. *J Pain Symptom Manage* 37:77-84.
- Krames ES, Wilkie DJ, Gershow J (1986), Intrathecal D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin (DADL) restores analgesia in a patient analgetically tolerant to intrathecal morphine sulfate. *Pain* 24:205-209.
- Kuniyasu H, Luo Y, Fujii K, Sasahira T, Moriwaka Y, Tatsumoto N, Sasaki T, Yamashita Y, Ohmori H (2010), CD10 enhances metastasis of colorectal cancer by abrogating the anti-tumoural effect of methionine-enkephalin in the liver. *Gut* 59:348-356.
- Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Mach DB, Pomonis JD, Keyser CP, Rathbun M, Clohisy DR, Honore P, Yaksh TL, Mantyh PW (2002), Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. *Pain* 99:397-406.

- Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP (2002), Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2:201-209.
- Martin-Kleiner I, Gabrilovac J, Kusec R, Boranic M (2003), Methionine enkephalin suppresses metabolic activity of a leukemic cell line (NALM-1) and enhances CD10 expression. *Int Immunopharmacol* 3:707-711.
- Martin M, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL (2003), Acute antinociceptive responses in single and combinatorial opioid receptor knockout mice: distinct mu, delta and kappa tones. *Eur J Neurosci* 17:701-708.
- Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, Kidd BL, Glatt M, Muller M, Hattenberger M, Vaxelaire J, O'Reilly T, Wotherspoon G, Winter J, Green J, Urban L (2002), A rat model of bone cancer pain. *Pain* 96:129-140.
- Mercadante S (1997), Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain* 69:1-18.
- Mercadante S (2010), Intravenous morphine for management of cancer pain. *Lancet Oncol* 11:484-489.
- Mercadante S, Arcuri E (1998), Breakthrough pain in cancer patients: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev* 24:425-432.
- Mercadante S, Ferrera P, Villari P, Arcuri E (2003), Hyperalgesia: an emerging iatrogenic syndrome. *J Pain Symptom Manage* 26:769-775.
- Meuser T, Pietruck C, Radbruch L, Stute P, Lehmann KA, Grond S (2001), Symptoms during cancer pain treatment following WHO-guidelines: a longitudinal follow-up study of symptom prevalence, severity and etiology. *Pain* 93:247-257.
- Mika J, Przewlocki R, Przewlocka B (2001), The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 415:31-37.
- Morinville A, Cahill CM, Aibak H, Rymar VV, Pradhan A, Hoffert C, Mennicken F, Stroh T, Sadikot AF, O'Donnell D, Clarke PB, Collier B, Henry JL, Vincent JP, Beaudet A (2004a), Morphine-induced changes in delta opioid receptor trafficking are linked to somatosensory processing in the rat spinal cord. *J Neurosci* 24:5549-5559.
- Morinville A, Cahill CM, Kieffer B, Collier B, Beaudet A (2004b), Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain* 109:266-273.
- Moulin DE, Max MB, Kaiko RF, Inturrisi CE, Maggard J, Yaksh TL, Foley KM (1985), The analgesic efficacy of intrathecal D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain* 23:213-221.
- Nadal X, Banos JE, Kieffer BL, Maldonado R (2006), Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 23:830-834.
- Onofrio BM, Yaksh TL (1983), Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet* 1:1386-1387.
- Ossipov MH, Lai J, King T, Vanderah TW, Porreca F (2005), Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Biopolymers* 80:319-324.
- Petrillo P, Angelici O, Bingham S, Ficalora G, Garnier M, Zaratini PF, Petrone G, Pozzi O, Sbacchi M, Stean TO, Upton N, Dondio GM, Scheideler MA (2003), Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8aalpha,8abeta, 12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]iso quinoline hydrochloride (SB-

- 235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1079-1089.
- Porreca F, Heyman JS, Mosberg HI, Omnaas JR, Vaught JL (1987), Role of mu and delta receptors in the supraspinal and spinal analgesic effects of [D-Pen2, D-Pen5]enkephalin in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 241:393-400.
- Portenoy RK, Lesage P (1999), Management of cancer pain. *Lancet* 353:1695-1700.
- Ruiz-Garcia V, Lopez-Briz E (2008), Morphine remains gold standard in breakthrough cancer pain. *BMJ* 337:a3104.
- Schulman KL, Kohles J (2007), Economic burden of metastatic bone disease in the U.S. *Cancer* 109:2334-2342.
- Silverman SM (2009), Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner. *Pain Physician* 12:679-684.
- Stewart PE, Hammond DL (1994), Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 268:701-708.
- Urch C (2004), The pathophysiology of cancer-induced bone pain: current understanding. *Palliat Med* 18:267-274.
- Wacnik PW, Kehl LJ, Trempe TM, Ramnaraine ML, Beitz AJ, Wilcox GL (2003), Tumor implantation in mouse humerus evokes movement-related hyperalgesia exceeding that evoked by intramuscular carrageenan. *Pain* 101:175-186.
- Yamamoto J, Kawamata T, Niiyama Y, Omote K, Namiki A (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* 151:843-853.
- Zeppetella G (2009), Impact and management of breakthrough pain in cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* 3:1-6.

6 DISCUSSION

6.1 RETOUR SUR L'ARTICLE

Cette étude avait pour but d'évaluer le rôle de DOPR exprimé au niveau spinal dans le traitement de la douleur induite par le cancer des os. En utilisant le modèle murin de douleur osseuse caractérisé lors d'une étude antérieure à laquelle j'ai contribué (Dore-Savard et al., 2010), nous avons confirmé les effets analgésiques d'un agoniste sélectif des récepteurs opioïdes delta, la deltorphine II, administré par la voie intrathécale. La deltorphine II a diminuée de manière dose-dépendante l'allodynie mécanique 14 jours après l'implantation des cellules mammaires syngéniques, MRMT-1, dans le fémur de rats. L'administration d'un antagoniste sélectif delta, le naltrindole, a permis de confirmer que l'analgésie était dépendante de DOPR. En utilisant le modèle de douleur inflammatoire induit par l'injection de l'adjuvant complet de Freund (CFA), nous avons aussi démontré que la deltorphine II était équipotente pour soulager la douleur inflammatoire et cancéreuse. Les résultats de cette étude montrent, pour la première fois, que l'activation spinale des DOPRs provoque une analgésie significative, à des doses équivalentes aussi bien pour réduire la douleur inflammatoire que la douleur osseuse due au cancer, chez le rat. Nos observations suggèrent que DOPR représente une cible potentielle pour le développement de nouvelles thérapies analgésiques dans le traitement de la douleur cancéreuse.

6.2 IMPLICATION DE DOPR DANS LA DOULEUR CANCÉREUSE

6.2.1 Rôle de DOPR au niveau spinal

Plusieurs évidences supportent le rôle de DOPR au niveau spinal pour moduler les comportements douloureux. En 1987, une première étude a démontré que les agonistes DOPR produisent une analgésie puissante lorsqu'administrés par voie intrathécale à des souris (Porreca et al., 1987). Au fil des ans, le DOPR a émergé comme une cible thérapeutique potentielle pour le développement de nouveaux analgésiques pour traiter la douleur résultante de différentes étiologies. Plusieurs groupes de chercheurs ont rapporté que les agonistes DOPR administrés par la voie spinale ont de puissants effets

analgésiques dans des modèles d'animaux précliniques de douleur inflammatoire (Stewart et Hammond, 1994; Fraser et al., 2000a; Cahill et al., 2003; Petrillo et al., 2003b; Morinville et al., 2004b; Gendron et al., 2007a; Gendron et al., 2007b) et neuropathique (Mika et al., 2001; Petrillo et al., 2003b; Holdridge et Cahill, 2007; Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2011). De plus, des cas cliniques ont montré les effets spinaux d'agonistes delta chez des patients souffrant de douleur cancéreuse et tolérants à la morphine (Onofrio et Yaksh, 1983; Moulin et al., 1985; Krames et al., 1986).

Au niveau spinal, nous avons démontré dans cette étude que la dose intrathécale de deltorphine II nécessaire pour diminuer la douleur cancéreuse est équivalente à la dose requise pour atténuer la douleur inflammatoire et ce, pour un même niveau d'allodynie. Ces observations suggèrent que la deltorphine II conserve son efficacité analgésique dans la douleur osseuse, comparativement à la morphine qui voit son potentiel analgésique réduit de 4 à 10 fois dans un autre modèle de douleur cancéreuse (Luger et al., 2002) (Figure 11). Cette étude a comparé l'efficacité de la morphine à différentes doses dans un modèle d'ostéosarcome de souris à un modèle inflammatoire (CFA). Selon les différents

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

□ p < 0.05

Figure 11. Efficacité de la morphine systémique dans le modèle cancer d'ostéosarcome et le modèle inflammatoire (CFA). Les animaux atteints de cancer nécessitent des doses significativement plus élevées de morphine sulfate pour contrer la douleur comparativement au modèle CFA. Les encadrés jaunes, verts et rouges montrent une augmentation de 5X, 2.3X et 2X, respectivement, de la dose de morphine sulfate requise pour diminuer la douleur cancéreuse comparativement au modèle CFA. Source : (Luger et al., 2002)

types de tests douloureux effectués, les auteurs de cette étude ont observé, à doses équivalentes, que la morphine sulfate induit une meilleure analgésie chez les souris CFA que celle portant un sarcome. De façon similaire, les humains souffrant de douleurs cancéreuses requièrent généralement des doses plus élevées de morphine par rapport aux patients atteints de douleurs inflammatoires (Mercadante et Arcuri, 1998; Mercadante, 2010). Ces constatations viennent supporter l'utilité éventuelle d'employer des agonistes DOPR comme alternative aux agents morphiniques en clinique.

Chez des patients tolérants à la morphine, les effets spinaux de DOPR ont réduit significativement les comportements douloureux liés au cancer (Onofrio et Yaksh, 1983; Moulin et al., 1985; Krames et al., 1986). Ces données proposent que l'efficacité analgésique delta est toujours présente suite à un traitement chronique à la morphine. Ceci laisse entrevoir l'hypothèse qu'un pré-traitement à la morphine pourrait augmenter le potentiel analgésique des agonistes delta dans un état de douleur osseuse. Tel que rapporté dans les travaux antérieurs du laboratoire (Gendron et al., 2006; Gendron et al., 2007b) et par d'autres groupes (Cahill et al., 2001b; Morinville et al., 2004b), un pré-traitement à la morphine potentialise les effets des agonistes delta dans un modèle inflammatoire. Dans cette optique, il serait intéressant d'évaluer si les agonistes delta conservent ou augmentent leurs propriétés analgésiques chez des animaux cancéreux tolérants à la morphine. Ainsi, il serait possible de renforcer l'hypothèse que les effets analgésiques des agonistes delta sont améliorés dans un état de douleur inflammatoire, neuropathique et possiblement cancéreux.

Afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel de DOPR au niveau spinale lors de l'analgésie, il serait pertinent de vérifier l'impact de la deltorphine II sur les médiateurs neurochimiques de la douleur dans la moelle épinière. Parmi les divers neuromodulateurs relâchés (CGRP, substance P, glutamate) lors de la transmission du signal douloureux dans la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 12), la substance P (SP) a un rôle particulièrement important dans le processus douloureux de par ses interactions étroites avec le système opioïdérique (Guan et al., 2005). La substance P est présente dans les fibres peptidergiques des DRG (McCarthy et Lawson, 1989) où l'on retrouve également

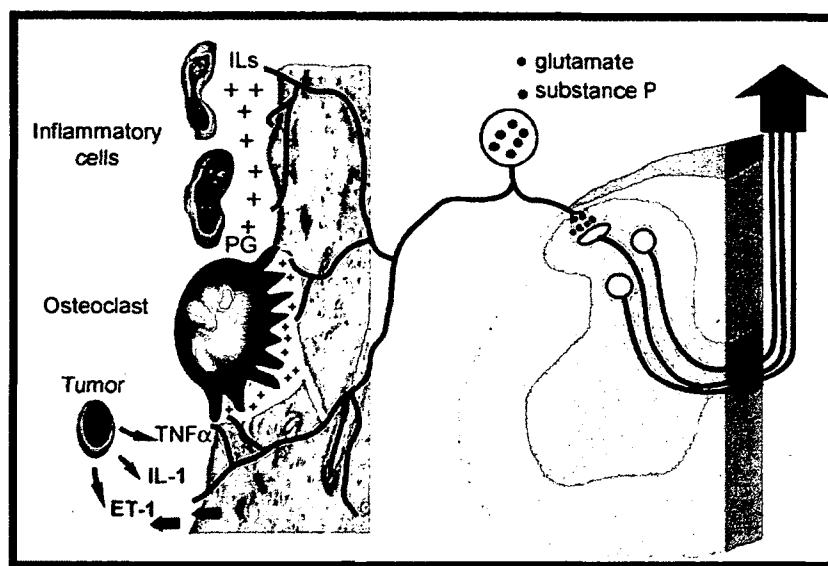


Figure 12. Neuromodulateurs spinaux impliqués dans le mécanisme de la douleur cancéreuse. La libération de substance P au niveau des DRG et de la corne dorsale de la moelle épinière a un rôle particulièrement important dans le développement de la douleur cancéreuse. Source : (Luger et al., 2005)

le DOPR (Dado et al., 1993; Ji et al., 1995; Zhang X. et al., 1998). Il est possible de faire varier les niveaux de substance P des fibres afférentes primaires par des stimuli non-dououreux mécaniques ou dououreux chimiques (capsaïcine, formaline). Suite à la relâche de substance P induite par un stimulus mécanique normalement non-dououreux dans des modèles murins de CIBP, il a été observé que la substance P se lie et active le récepteur NK-1 pour induire son internalisation. Également, il a été montré que des stimuli mécaniques non-dououreux appliqués à des souris naïves et sham n'induisent pas l'internalisation du complexe substance P-NK1 (SP-NK1) (Figure 13A). À l'opposé, une forte internalisation est observée chez des souris ayant le CIBP quand un stimulus non-dououreux est appliqué au membre affecté (portant la tumeur) (Schwei et al., 1999; Honore et al., 2000b) (Figure 13B). Ces études suggèrent que l'application d'un stimulus normalement non-dououreux induit la relâche de SP dans la moelle épinière suivi par l'internalisation du complexe ligand-récepteur SP-NK1. Donc, si un agent analgésique est administré avant l'application du stimulus, on s'attendrait à voir une diminution de la relâche de la SP des fibres afférentes reflétée par une réduction de l'internalisation SP-NK1. Cette technique de mesure indirecte de l'action d'un composé analgésique a été validée et utilisée dans plusieurs études antérieures (Kondo et al., 2005; Nazarian et al.,

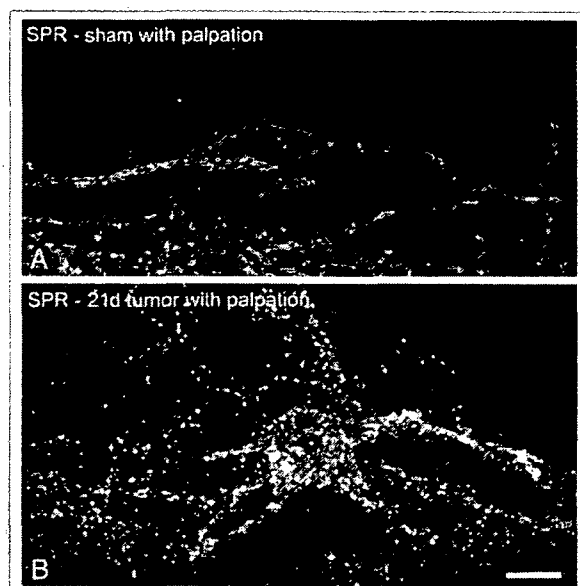


Figure 13. Effets de la palpation du genou sur l'internalisation du complexe substance P et de son récepteur NK-1 dans la moelle épinière de rats cancéreux. La palpation du genou est un stimulus mécanique normalement non-douloureux qui peut induire la relâche de substance P dans la moelle épinière dans certaines conditions. Lorsqu'appliquée à un animal sham (A), la palpation du genou n'induit pas l'internalisation du complexe substance P-NK1, alors que chez des animaux cancers (B) une forte internalisation est observée. Source : (Schwei et al., 1999)

2008) afin d'évaluer le pouvoir analgésique spinal d'une molécule par internalisation. Cet outil a permis à notre laboratoire de démontrer la capacité inhibitrice de la deltorphine II intrathécale sur la relâche de SP des fibres afférentes via la diminution de l'internalisation SP-NK1 dans la moelle épinière de rat (Beaudry et al., 2011). De cette même façon, il serait intéressant de déterminer dans le modèle de douleur due au cancer des os, si l'administration de deltorphine II intrathécale précédant le stimulus non-douloureux mécanique peu induire des changements dans le niveau de SP affectant l'internalisation SP-NK1 dans la moelle épinière. Ceci permettrait de mieux comprendre les interactions et le rôle de DOPR dans l'analgésie spinale du modèle cancéreux.

6.2.2 Localisation de DOPR

Depuis plusieurs années, la compréhension de la régulation de l'expression du récepteur delta, de son activité et des mécanismes qui contribuent à l'analgésie médiée par DOPR ont beaucoup évolués. Un facteur important impliqué dans l'analgésie des

opioïdes delta est le niveau d'expression du récepteur à la surface membranaire des neurones dans les différents sites des voies de la transmission de la douleur. La variation de la densité de DOPR est très dynamique selon différentes conditions. Plusieurs études ont démontré que l'expression de DOPR change dans des modèles de douleur chronique inflammatoire et neuropathique (Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2011). En particulier, suite à un traitement à la morphine ou lors de douleur inflammatoire, DOPR est augmenté à la surface cellulaire, ce qui amène un plus grand nombre de récepteurs disponibles pour être activés. Effectivement, il a été montré chez les rongeurs qu'un pré-traitement à la morphine permet d'augmenter le nombre de DOPR à la membrane plasmique des neurones de la moelle épinière (Cahill et al., 2001b; Morinville et al., 2003; Morinville et al., 2004a) et des DRG (Gendron et al., 2006) et que ceci s'accompagne d'une potentialisation des propriétés analgésiques des agonistes DOPR (Cahill et al., 2001b; Morinville et al., 2003). Ainsi, l'effet d'un pré-traitement à la morphine sur la biodisponibilité de DOPR chez les animaux cancers serait pertinent à évaluer.

Dans le modèle inflammatoire CFA, notre laboratoire a démontré qu'une régulation à la hausse de DOPR à la membrane plasmique des neurones de la moelle épinière augmente l'efficacité des agonistes delta (Cahill et al., 2003; Gendron et al., 2006; Gendron et al., 2007a). Le même phénomène a également été observé dans les modèles de douleur neuropathique (Morinville et al., 2004a). Actuellement, dans une condition de douleur induite par le cancer des os, il n'y a aucune étude qui indique si les niveaux de DOPR dans les neurones spinaux sont augmentés ou non. Toutefois, puisque les doses de deltorphine II utilisées dans notre étude n'avaient aucun effet analgésique sur la patte controlatérale, nos observations suggèrent que les DOPRs sont peu ou pas activés en absence de douleur cancéreuse. Ceci supporte l'hypothèse que son niveau d'expression membranaire est augmenté en présence d'un état de douleur cancéreuse. De plus, considérant que le CIBP est une douleur chronique ayant une composante inflammatoire (Honore et al., 2000b), les résultats obtenus dans notre étude laissent croire que DOPR pourrait, comme dans le modèle inflammatoire CFA, avoir une augmentation de sa densité membranaire dans la moelle épinière et les DRG. Ainsi, il serait intéressant de vérifier la localisation de DOPR par la technique de microscopie électronique, largement

utilisée dans les études antérieures (Dado et al., 1993; Ji et al., 1995; Zhang X. et al., 1998; Gendron et al., 2006), dans la corne dorsale de la moelle épinière et des DRG et ce, à différents stades (précoce, tardif) du développement de la douleur cancéreuse. Aussi, l'utilisation du ligand fluorescent ω -Bodipy red-[D-Ala²]-deltorphin I est une autre technique de détection qui permettrait de fournir un indice sur la densité membranaire de DOPR (Cahill et al., 2001b; Gendron et al., 2006). En utilisant ces outils de visualisations pour localiser DOPR, nous serions en mesure de vérifier s'il y a une corrélation entre la densité membranaire de DOPR et les effets analgésiques de la deltorphine II observés dans notre étude.

D'autres mécanismes, outre la douleur inflammatoire et la morphine, peuvent augmenter l'activité de DOPR. Notamment, dans une situation de douleur persistante, l'implication du NGF accentue la biodisponibilité de DOPR à la surface cellulaire (Bie et al., 2010). Bie et ses collègues ont en effet démontré qu'un traitement prolongé au NGF provoque l'apparition de nouveaux récepteurs fonctionnels sur les terminaisons synaptiques de neurones du cerveau, *in vitro* et *in vivo* chez des souris tolérantes à la morphine. De plus, la présence du NGF a été notée dans la douleur cancéreuse. En effet, le NGF est fortement exprimé par la tumeur et les cellules inflammatoires dans l'environnement osseux chez l'animal cancéreux (Halvorson et al., 2005; Sevcik et al., 2005). Également, l'anticorps anti-NGF a la capacité de diminuer des marqueurs neurochimiques (ATF-3, CGRP) associés à la sensibilisation centrale et périphérique, dans les DRG et la moelle épinière, lors de l'établissement du CIBP (Sevcik et al., 2005). Ces études laissent entrevoir une implication possible du NGF dans le CIBP et l'adressage à la membrane de DOPR. Il serait intéressant d'évaluer la densité membranaire de DOPR dans la moelle épinière et les DRG de rats cancéreux suite à l'administration de l'anticorps anti-NGF.

6.3 EFFICACITÉ DES MODÈLES ANIMAUX

6.3.1 Comparaison des modèles animaux

Au cours de la dernière décennie, les premiers modèles animaux de douleur due au cancer des os ont été développés (Schwei et al., 1999; Cain et al., 2001; Medhurst et al., 2002; Wacnik et al., 2003; Zhang R. X. et al., 2005). En termes de croissance tumorale, de remodelage osseux et de douleurs osseuses, ces modèles semblent refléter divers aspects du cancer des os humains (Schwei et al., 1999; Honore et Mantyh, 2000). L'information engendrée à partir de ces modèles a commencée à fournir un aperçu des mécanismes qui génèrent et maintiennent la douleur osseuse. Les modèles animaux ostéolytiques sont les modèles les plus utilisés à ce jour, comparativement aux modèles ostéoblastiques, probablement du fait de l'incidence plus élevée des cancers ostéolytiques qui représentent 70% des cas chez les femmes avec le cancer du sein atteintes de métastases secondaires (Therriault et Hortobagyi, 1992). Les similitudes et les différences entre les modèles animaux induits par le cancer des os en comparaison avec notre modèle (Dore-Savard et al., 2010) seront discutées dans cette section.

Le tout premier modèle animal de douleur cancéreuse a été développé par l'équipe de Schwei en 1999 (Schwei et al., 1999). Ils ont mis au point une méthode d'implantation locale de cellules cancéreuses de fibrosarcome dans le fémur de souris. Ils ont démontré que cette implantation conduit à un animal ayant une douleur osseuse localisée. Ce modèle est adéquat pour étudier la physiopathologie du CIBP. Toutefois, étant donné que le site d'insertion des cellules dans le fémur n'était pas complètement étanche, une évansion locale de la tumeur a été notée.

	Études	Espèce animal	Site injection	Cellules	Type cancer
Souris	Schwei MJ 1999	Souris C3H/HeJ	Fémur distal	NCTC 2472 Fibrosarcome	Ostéolytique
	Cain DM 2001	Souris C3H/He	Calcaneus	NCTC 2472 Fibrosarcome	Ostéolytique
	Wacnik PW 2003	Souris C3H/He mâle	Humerus	NCTC 2472 Fibrosarcome	Ostéolytique
Rat	Zhang RX 2005	Rat Copenhagen mâle	Tibia	AT-1.3	Ostéoblastique
	Medhurst S.J. 2002	Rat Sprague-Dawley femelle	Tibia	MRMT-1 ostéosarcome	Ostéolytique
	Dore-Savard L, Otis V et al. 2010	Rat Sprague-Dawley mâle	Fémur	MRMT-1 ostéosarcome	Ostéolytique

Tableau 4. Tableau comparatif des différents modèles de douleur due au cancer des os chez la souris et le rat. Chez la souris, les trois modèles existants utilisent la même souche de souris, lignée cellulaire, mais différent par leurs sites d'injections. Chez le rat, deux modèles utilisent la même souche d'animaux et la même lignée cellulaire pour générer un cancer ostéolytique alors que le modèle proposé par Zhang diffère par son caractère ostéoblastique. L'encadré rouge représente notre modèle d'étude.

Depuis 1999, plusieurs modèles utilisant le même principe d'implantation locale ont été décrits (Tableau 4). Les modèles animaux ont été élaborés, dans un premier temps, pour imiter la condition humaine. Il s'agissait de comprendre la douleur due au cancer des os. Des modèles de souris avec un cancer de l'os calcanéum (Cain et al., 2001), de l'humérus (Wacnik et al., 2003), ou du tibia chez le rat (Medhurst et al., 2002; Zhang R. X. et al., 2005) ont été induits par des cellules mammaires MRMT-1 (Mammary Rat Metastasis Tumor) (Medhurst et al., 2002), 4T.1 (Zwolak et al., 2008) et Walker 256 (Mao-Ying et al., 2006), ou de la prostate AT-3.1 (Zhang R. X. et al., 2005). Ces modèles ont servi également à caractériser les changements locaux ou la plasticité neuronale des régions spinales innervant l'os. Il existe aussi les modèles de souris avec l'inoculation intramédullaire du fémur de lignées cellulaires de fibroblastes induisant la douleur osseuse. Un exemple est le fibrosarcome (Cain et al., 2001; Wacnik et al., 2003)). Cependant, ces modèles sont basés sur l'imitation des cancers primaires des os, qui ne constitue que 0,19% de tous les cancers. L'importance de créer des modèles qui imitent des cas fréquents de cancers des os est un critère important pour la représentativité du

modèle. En effet, les cancers des os secondaires provenant du cancer du sein ou de la prostate, connus pour leur capacité à faire des métastases osseuses (Sabino et al., 2003), sont plus fréquents (60% des cancers secondaires) que les cancers primaires des os (0,19 % des cancers primaires) (van den Beuken-van Everdingen et al., 2007).

À ce jour, les modèles de dissémination des métastases à l'os constituent la meilleure représentation clinique des métastases osseuses. Toutefois, il est difficile de cibler un site particulier d'étude étant donné l'étendue multi-sites des métastases. Ceci rend d'autant plus difficile l'isolement des mécanismes contribuant à la douleur due au cancer des os (Canon et al., 2008; Rozel et al., 2009). D'un autre côté, les modèles utilisant l'implantation locale dans l'os pour imiter la douleur osseuse utilisent souvent des lignées cellulaires de cancers primaires (Schwei et al., 1999; King et al., 2007; Niiyama et al., 2009).

Nous avons donc développé un modèle de douleur cancéreuse induit par l'implantation, dans le fémur, de cellules cancéreuses mammaires du sein chez le rat mâle (Chirurgie cancer-Annexe 1). Le choix réfléchi d'utiliser des rats mâles est d'éviter les variations hormonales qui sont bien connues pour influencer (Aloisi et Bonifazi, 2006; Cairns et Gazerani, 2009) la réponse à la douleur. Pour nos investigations, il était préférable d'effectuer nos études sur les rats mâles afin de limiter les sources de variations et de nous permettre de comparer l'évolution de la douleur et la progression du remodelage osseux aux autres modèles rapportés dans la littérature. En effet, les cellules MRMT-1 ont été abondamment utilisées dans le passé pour évaluer la douleur osseuse due au cancer mammaire suivant l'inoculation de cellules cancéreuses autant chez les mâles (Urch C. E. et al., 2003; Donovan-Rodriguez et al., 2004; Urch C. E. et al., 2005) que les femelles (Medhurst et al., 2002; Walker et al., 2002; Nagae et al., 2007). Néanmoins, il serait tout de même intéressant d'évaluer, dans les futures études, les effets de l'influence hormonale, sur la croissance tumorale et la réponse à la douleur suivant l'administration d'agonistes delta.

Puisque le rat est l'une des espèces les plus étudiées dans les paradigmes de la douleur (Mogil, 2009), nous avons donc choisi une lignée cellulaire provenant d'un carcinome mammaire de rat. Le caractère intrinsèque de ces cellules syngéniques à métastaser dans les organes éloignés, justifie ce choix représentatif de la clinique. En 1975, la toute première étude, décrivant la génération de cette lignée cellulaire, a montré la capacité de ces cellules à se métastaser à des organes éloignés (Harada, 1975). D'ailleurs, dans cette étude, Harada a détecté macroscopiquement la présence de nombreuses cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques et les poumons plusieurs semaines après l'implantation d'une tumeur formée de MRMT-1 dans le

fémur. Cette constatation reflète les résultats de l'étude clinique de Coleman et Rubens démontrant que parmi les 587 patients en phase terminale d'un cancer mammaire, 83% avaient des métastases osseuses et 27% des métastases pulmonaires et hépatiques (Coleman et Rubens, 1987). Ces études sont aussi cohérentes avec nos observations

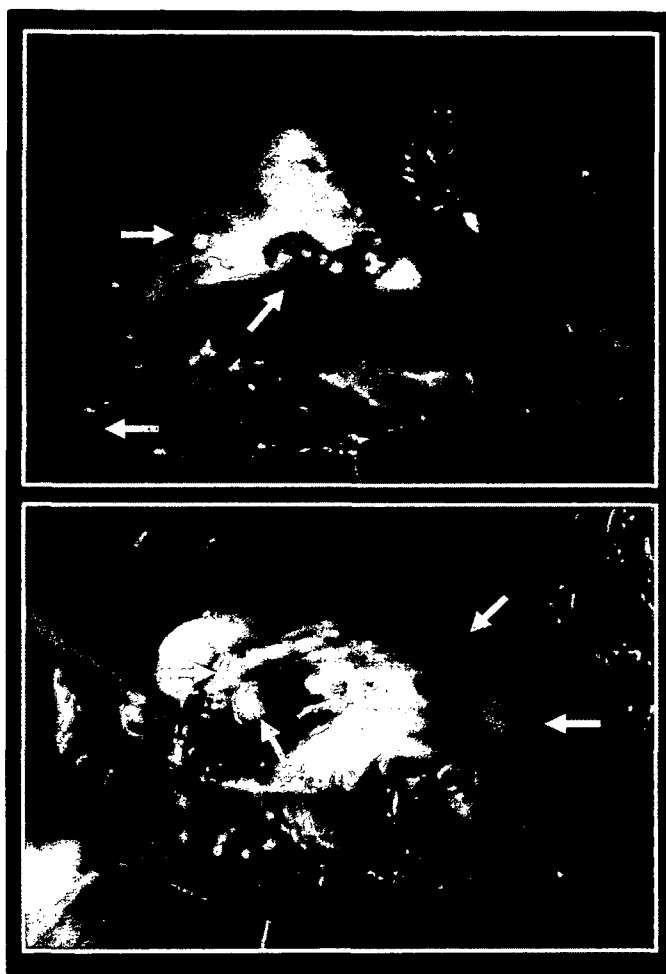


Figure 14. Métastases pulmonaires originaires du cancer osseux chez un rat 14 jours post-chirurgie. Lors de l'autopsie, 14 jours suivant l'implantation des cellules MRMT-1 dans le fémur de rats Sprague-Dawley mâles, il y a présence de métastases pulmonaires. Les flèches jaunes indiquent l'emplacement des nodules pulmonaires. Source : Images prises par Valérie Otis.

faites. Lors de l'autopsie, 14 jours suivant l'implantation des MRMT-1, nous avons décelé chez $\pm 25\%$ des rats la présence de métastases pulmonaires (Figure 14). Les études mentionnées et nos résultats montrent donc le caractère invasif et agressif de la lignée cellulaire MRMT-1 *in vivo*.

L'utilisation du modèle animal d'implantation directe des cellules cancéreuses dans l'espace intramédullaire semble être le plus représentatif parmi tous les modèles existants pour l'étude de la douleur cancéreuse. Le problème majeur avec ce modèle est la fermeture du site d'injection. Ce site ne peut être refermé au moyen d'agents d'étanchéités classiques mais la surface osseuse est un milieu humide rendant difficile l'adhérence de la cire ou de la poudre d'os. Conséquemment, les cellules tumorales s'échappent rapidement du canal médullaire pour croître dans l'articulation et le tissu mou environnant. La tumeur extrasquelettique formée interfère non seulement à l'analyse comportementale, mais atteint des fibres nerveuses contribuant à la douleur neuropathique. Pour limiter ce biais, nous avons choisi d'adapter et d'améliorer ce modèle en colmatant le site d'injection avec un amalgame dentaire qui se lie étroitement et scelle la cavité creusée dans la tête du fémur. L'amalgame dentaire a la propriété de pouvoir adhérer efficacement à l'os suite à sa polymérisation. Ce colmatage du site d'injection nous a permis de contenir les cellules tumorales au sein de l'espace intramédullaire et prévenir l'invasion dans les muscles environnants (Luger et al., 2001).

Suite à l'implantation des cellules MRMT-1 dans le fémur du rat, nous avons observé le développement des comportements douloureux chez les animaux atteints. Ces comportements se traduisaient visuellement par un boitement lors de la marche, un réflexe de flexion du membre atteint et quantitativement par un seuil de retrait diminué à l'application d'une pression mécanique. Ces manifestations douloureuses correspondent chez l'humain à la douleur provoquée par le mouvement, des douleurs spontanées et de la douleur continue, respectivement. En effet, la douleur spontanée (non-volontaire) et la douleur durant la marche (volontaire) sont les premiers symptômes cliniques présents et détectés lorsque les patients ayant des métastases osseuses consultent leur médecin. La douleur spontanée et incidente sont très chez les cancéreux et sont autant indicateurs du

risque de fractures (Aebi, 2003; Donthineni, 2009; Mercadante et al., 2009). Toutefois, il est difficile d'évaluer et de quantifier ces 2 types de douleurs chez les animaux. Malgré les nombreuses tentatives de développer des essais pour détecter la douleur spontanée chez les rongeurs, à ce jour aucun test n'a été adéquatement standardisé et validé pour en tirer des conclusions significatives et transposables en clinique (Mogil, 2009). Ainsi, la mesure du seuil de retrait, évoqué par un stimulus, reste le pilier de l'évaluation de la douleur cancéreuse en pré-clinique (Luger et al., 2002; Medhurst et al., 2002). Dans ce sens, nous avons évalué l'apparition de l'allodynie par l'application d'un stimulus mécanique tactile (filaments de von Frey) normalement non-douloureux à la surface plantaire de la patte affectée et saine. Également, il aurait été pertinent de vérifier la présence d'hyperalgésie thermique des rats cancéreux tel que décelée chez les patients métastatiques (van den Beuken-van Everdingen et al., 2007).

Malgré les avantages apparents de notre modèle animal et de notre étude, nous sommes conscients de certaines limitations. D'ailleurs, nous avons opté lors de l'étape de l'implantation des cellules dans le fémur, pour l'arthrotomie. L'arthrotomie consiste au déplacement du ligament patellaire du genou permettant d'avoir accès à la fosse intercondylienne où se situe le site d'injection des MRMT-1. Ainsi, l'insertion directe de l'aiguille, parallèlement au fémur, dans le canal médullaire est facilitée et se traduit par un taux de réussite de 90 %, 9 rats sur 10 développent le cancer. Le déplacement de la patella peut entraîner une inflammation précoce et une douleur transitoire suite à la chirurgie. Pour contrôler ces artéfacts, nous avons utilisé un groupe sham c'est-à-dire des rats ayant subi la chirurgie avec l'implantation de milieu de culture au lieu de cellules cancéreuses. Ces animaux contrôles n'ont montré aucun signe de douleur résiduelle lors des tests effectués aux jours 3, 7, 11, 14 post-chirurgie (Figure 1A, p.59).

Une autre faiblesse de l'étude est l'utilisation aiguë de l'agoniste delta, deltorphine II. Une administration chronique de la deltorphine II refléterait davantage la situation d'un patient cancéreux. On obtiendrait ainsi de l'information à long terme sur le pouvoir analgésique de la deltorphine II et on pourrait évaluer si l'animal développe une tolérance à la deltorphine II. Une autre limitation des présents travaux est la voie

d'injection intrathécale. Il serait plus approprié d'utiliser la voie systémique avec les agonistes sélectifs delta qui traversent la barrière hémato-encéphalique, par exemple le SNC-80, ce qui coïnciderait aux voies d'administration usuelles des opioïdes (per os, sous-cutané, intraveineux) chez l'humain. Cependant, la majorité des agonistes delta les mieux caractérisés et qui passent la barrière hémato-encéphalique (SNC-80, BW373U86) provoque des effets secondaires néfastes comme des convulsions (Dykstra et al., 1993; Negus et al., 1994). L'utilisation de la voie intrathécale reste donc essentielle dans nos études pour délivrer les agonistes sélectifs delta n'induisant pas d'effets secondaires centraux sévères.

Une limitation générale de tous les modèles animaux de cancers est l'interprétation des données précliniques vers la réalité clinique. Il faut être prudent lorsqu'on extrapole à la clinique les données provenant d'études animales. Bien que les modèles pré-cliniques développent des comportements douloureux qui ressemblent aux divers états de douleur chez l'homme, on se sait pas si ces caractéristiques comportementales correspondent à la perception humaine de la douleur. On peut seulement supposer que la manifestation comportementale de l'animal représente une similarité clinique de la douleur chez un patient.

Malgré les limitations de notre modèle animal, celui-ci répond aux critères de validité pour un modèle animal de douleur. Selon Mogil, Rice et Vierck, pour qu'un modèle pré-clinique de douleur soit valide, un certain nombre de critères doit être rempli (Rice et al., 2008; Vierck et al., 2008; Mogil, 2009). 1) Le modèle doit fournir des données comportementales reproductibles et quantifiables. La caractérisation comportementale complète du modèle ostéosarcome a été montrée par nos travaux (Dore-Savard et al., 2010) et reproduite dans les travaux décrits dans ce mémoire (Otis et al., 2011). 2) Le modèle doit avoir des comportements douloureux qui ressemblent étroitement à certains symptômes de la douleur observés chez les humains (par exemple, l'allodynie, hyperalgésie). L'observation de comportements douloureux comme le boitement, la flexion du membre atteint et la détection d'allodynie correspondent aux symptômes cliniques associés à la douleur cancéreuse (van den Beuken-van Everdingen

et al., 2007). 3) Les données comportementales doivent corrélérer avec les réponses douloureuses observées en clinique et les thérapies utilisées chez l'homme. Dans notre modèle, l'utilisation des agonistes opioïdiques delta fait partie de la famille des antalgiques qui sont communs en clinique pour traiter les douleurs sévères et intenses de la maladie. Le modèle cancer développé dans le laboratoire possède donc tous les critères et caractéristiques exigées; cela lui confère son utilité pour l'étude de la douleur osseuse en pré-clinique.

6.3.2 Représentativité de la douleur cancéreuse humaine

On se doit de toujours garder à l'esprit une question cruciale lors de l'utilisation des modèles animaux : est-ce que le modèle animal choisi est le miroir de la condition clinique étudiée? Bien que certains modèles animaux représentent des conditions cliniques spécifiques (e.g. le modèle de neuropathie induit par la constriction chronique du nerf trijumeau et les modèles de constriction des nerfs périphériques), d'autres ne sont pas aussi précis (e.g. le modèle inflammatoire CFA et le test à la formaline) (Mogil, 2009). De plus, même si le modèle semble avoir une étroite ressemblance avec une condition spécifique, il est difficile de déterminer si elle représente la même entité pathologique que celle observée chez les patients et si elle répond de la même manière aux traitements pharmacologiques. Par conséquent, les applications cliniques des résultats des modèles animaux cancéreux nécessitent une analyse translationnelle complexe et approfondie avant de se conclure en une application directe (Mao, 2009). Néanmoins, le développement de modèles pré-cliniques mimant la douleur cancéreuse a considérablement amélioré la compréhension des composantes du CIBP et est nécessaire pour démystifier les mécanismes pathologiques de cette douleur unique et malcomprise. Il reste à espérer que la communication continue entre les experts scientifiques fondamentaux et les cliniciens mènera à de nouveaux progrès dans la lutte contre la douleur cancéreuse.

De plus, la représentativité de notre modèle cancéreux a suscité l'intérêt d'un scientifique de l'université McGill, Pr Jeffrey S. Mogil. Nous avons établi une collaboration visant à évaluer les effets d'inhibiteurs de kinases dans notre modèle. C'est

avec une grande fierté, que j'ai accepté de participer à cette collaboration; les résultats seront publiés sous peu. Brièvement, l'utilisation de trois inhibiteurs de kinases soit le AG1478, inhibiteur spécifique compétitif de l'activité tyrosine kinase du récepteur ErbB1 de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR), le gefitinib (Iressa®), inhibiteur réversible de haute sélectivité pour le récepteur ErbB1 (EGFR), utilisé en clinique pour le traitement des patients atteints d'un cancer pulmonaire avancé, et le lapatinib (Tykerb®/Tyverb®), inhibiteur réversible de haute sélectivité pour le récepteur ErbB2 (EGFR), utilisé comme traitement de première ligne pour les cancers mammaires métastatiques, ont été testés 14 jours après l'implantation des cellules MRMT-1 dans le fémur de rats. L'administration systémique de ces trois agents, dans trois groupes distincts de rats cancéreux, a montré des effets analgésiques significatifs pour le lapatinib et le gefitinib. À la lumière de ces résultats, les deux inhibiteurs de kinases utilisés en clinique démontrent un effet analgésique important dans la douleur cancéreuse pré-clinique; il reste à déterminer s'ils agissent sur la croissance tumorale.

7 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons décrit pour la première fois dans un modèle de douleur induite par le cancer des os, chez le rat, les effets analgésiques d'un agoniste sélectif DOPR, la deltorphine II, administré par voie spinale. En particulier, nous avons montré la relation des effets anti-allodymiques dose-dépendants de la deltorphine II dans la douleur induite par l'ostéosarcome et la douleur inflammatoire. Cette étude a permis de révéler un rôle important de DOPR dans le traitement de la douleur cancéreuse, mais il reste cependant plusieurs questions sans réponse. Plus de recherche nous permettra d'élucider et d'éclaircir davantage le rôle de DOPR et de son activité analgésique dans la douleur osseuse.

Un facteur important impliqué dans l'analgésie des opioïdes delta est le niveau d'expression du récepteur à la surface membranaire des neurones dans les différents sites des voies de la transmission de la douleur. Notre laboratoire a démontré, dans un modèle inflammatoire CFA, qu'une régulation à la hausse de DOPR à la membranaire plasmique des neurones de la moelle épinière augmente l'efficacité des agonistes delta (Gendron et al., 2006; Gendron et al., 2007a). Le même phénomène a également été observé dans les modèles de douleur neuropathique (Morinville et al., 2004a). Considérant que la douleur cancéreuse a une composante de douleur inflammatoire et neuropathique, dans un premier temps, il serait alors essentiel d'évaluer les effets de la douleur cancéreuse sur l'adressage membranaire de DOPR à la membrane plasmique en répondant à la question suivante : est-ce que la douleur induite par le cancer des os modifie les niveaux de DOPR à la membrane plasmique des neurones ? Et peut-on corrélérer ces niveaux avec les données comportementales obtenues précédemment ?

Dans un deuxième temps, il faudrait évaluer la tolérance croisée en répondant à la question suivante : est-ce que les agonistes delta conservent leurs propriétés analgésiques chez des animaux cancéreux tolérants à la morphine ?

Troisièmement, un objectif à long terme de ce projet serait de déterminer les effets des agonistes delta sur la prolifération des cellules tumorales dans le modèle cancer. Il faudrait répondre à la question suivante : est-ce que les agonistes delta influencent la

prolifération tumorale des cellules MRMT-1 ? En plus de l'analgésie induite par les agonistes delta (Baamonde et al., 2005; Brainin-Mattos et al., 2006; Otis et al., 2011), l'activation de DOPR réduit l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses (Martin-Kleiner et al., 2003; Jaglowski et al., 2005; Debruyne et al., 2010; Kuniyasu et al., 2010). La question suivante se pose donc : est-ce que les agonistes delta pourraient jouer un double rôle, anti-prolifératif et analgésique, dans le modèle cancer ?

Nous avons montré que l'efficacité de la deltorphine II est similaire (i.e. à des valeurs de ED50 comparables) dans les modèles cancer et inflammatoire, contrairement à la morphine, comme rapporté dans l'étude de Luger (Luger et al., 2002). Dans ce même ordre d'idées, il serait intéressant d'évaluer dans notre modèle cancer et le modèle inflammatoire l'effet maximal et la valeur de l'ED50 (i.e. dose d'agoniste à laquelle la douleur est réduite de 50%) de la morphine administrée par voie intrathécale. Ainsi, nous pourrions déterminer le pouvoir analgésique de la morphine et comparer son efficacité analgésique à celle de la deltorphine II dans les états de douleur inflammatoire et cancéreux.

Un autre objectif éventuel consisterait à tester de nouveaux ligands peptidomimétiques sélectif pour DOPR passant la barrière hémato-encéphalique et dépourvus des effets secondaires centraux rencontrés par plusieurs ligands non-peptidiques dans le modèle de douleur due au cancer des os. Ainsi, on pourrait comparer l'effet analgésique potentiel de ces peptides dans la douleur cancéreuse avec les autres modèles de douleurs étudiés dans le laboratoire soit le modèle CFA, formaline et sur l'anxiété induite par la douleur chronique. Ce projet de synthèse peptidique est un volet présentement en cours dans notre laboratoire, en collaboration avec le Pr Yves Dory du département de pharmacologie.

Finalement, si pour plusieurs patients le cancer des os est difficile à combattre, nous pouvons certainement améliorer leur qualité de vie en réduisant la douleur due au cancer. Une thérapie antidouleur dépourvue des effets secondaires normalement associés aux narcotiques constituerait une avancée majeure en clinique. À l'issue de ce projet, nous espérons être en mesure de déterminer si les agonistes sélectifs delta peuvent répondre à

ces attentes, c'est-à-dire contrer de façon efficace la douleur due au cancer des os tout en évitant l'apparition d'effets secondaires indésirables.

8 REMERCIEMENTS

« Tous les chemins mènent à Rome »

Ce proverbe romain reflète bien mon parcours de maîtrise plutôt inhabituel et parsemé d'obstacles parfois difficiles à surmonter pour arriver avec fierté à la fin de ce trajet mémorable.

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche, le Pr Louis Gendron, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir offert un projet si intéressant. Merci Louis d'avoir été présent pas à pas tout au long de mon projet et d'avoir été toujours à l'écoute de mes interrogations multiples. J'ai grandement apprécié que tu sois présent dans le laboratoire que ce soit pour me montrer les diverses techniques ou simplement venir superviser mon travail. Tu as su faire ressortir en moi une rigueur et un dévouement envers la science que j'ai appris à développer à tes côtés durant toutes ces années. Merci d'avoir toujours cru en moi lorsque moi je n'y croyais plus du tout. Tu es un patron très compréhensif et ton support dans les épreuves difficiles que la vie a mis sur mon parcours a été grandement apprécié.

J'aimerais également remercier tout les membres du « Labo Gendron » pour avoir construit ensemble une équipe ou plutôt une famille qui s'entraide et partage quotidiennement tous les hauts et les bas de la science. La science est un travail d'équipe et sans vous mon projet aurait évolué différemment. Merci d'avoir été là à tous les jours autant pour discuter de résultats scientifiques autant que non-scientifiques ou pour taquiner Louis. Je tiens à remercier tout particulièrement mes comparses du tout début de mon projet soit Véro, Dave, Hélène et Julie. Sans eux, l'ambiance du laboratoire n'aurait pas été aussi agréable. J'ai adoré travailler avec vous et passer des moments inoubliables autant au laboratoire qu'autour d'un repas bien arrosé. Je remercie également tous les autres membres du laboratoire que j'ai côtoyés de près ou de loin durant mes années à la maîtrise : Arnaud, Alex, Audrey, Kristina et tous les nouveaux venus que j'ai croisés sur mon chemin.

Également, je tiens à remercier le Pr Philippe Sarret pour m'avoir donné la possibilité de collaborer pour la caractérisation du modèle cancer. En particulier son étudiant au doctorat, Louis Doré-Savard, pour avoir travaillé ardemment ensemble afin d'arriver à une publication scientifique. Par le fait même, je veux remercier Karine Belleville, technicienne animalière du laboratoire de Phillippe Sarret, pour m'avoir montré, dès le tout début de mon projet, la chirurgie du modèle cancer et pour tous les conseils techniques que tu m'as donnés. Merci Karine pour ton expertise animale et ta grande disponibilité tout au long de mon projet, ce fut grandement apprécié.

J'aimerais remercier ma famille pour leur support et appui tout au long de mes études. Je remercie mes parents, Henriette et Jean-Guy, qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes études et de m'avoir appris à toujours persévérer jusqu'à la fin. Merci d'avoir été un pilier fort auquel je pouvais toujours m'appuyer dans les moments les plus difficiles. Merci à mes 3 sœurs et mon frère, d'avoir encouragé et aidé votre «petite sœur» tout au long de ses études, je vous en suis très reconnaissante. Je remercie ma petite princesse, Florence Béland, qui m'a donné le courage de continuer et d'aller jusqu'au bout de mes ambitions. Depuis ces 5 dernières années, tu as combattu plusieurs batailles contre la leucémie et durant tous ces moments vécus ensemble, tu m'as apporté, sans le savoir, une nouvelle perception de la vie. Tu m'as donné le courage de continuer puisqu'avec la santé tout est possible. Ces épreuves ont changé ma vision de la science et maintenant je peux confirmer que la science a sa raison d'être.

Finalement, je remercie Pr Louis Gendron, Pr Caroline Saucier et Pr Jean-Luc Ardilouze pour avoir accepté d'évaluer mon travail et d'allouer une partie de votre temps pour la lecture et la correction de mon mémoire.

9 RÉFÉRENCES

- Abbadie C. (2005) Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol*, 26, 529-534.
- Abbadie C, Lombard MC, Besson JM, Trafton JA, Basbaum AI. (2002) Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions. *Brain Res*, 930, 150-162.
- Ableitner A. (1994) Brain sites involved in delta-opioid receptor-mediated actions. *Eur J Pharmacol*, 271, 213-222.
- Aebi M. (2003) Spinal metastasis in the elderly. *Eur Spine J*, 12 Suppl 2, S202-213.
- Akiyama K, Gee KW, Mosberg HI, Hruby VJ, Yamamura HI. (1985) Characterization of [3H][2-D-penicillamine, 5-D-penicillamine]-enkephalin binding to delta opiate receptors in the rat brain and neuroblastoma--glioma hybrid cell line (NG 108-15). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 2543-2547.
- Aloisi AM et Bonifazi M. (2006) Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav*, 50, 1-7.
- Angst MS et Clark JD. (2006) Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology*, 104, 570-587.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, 9, 463-484.
- Arvidsson U, Dado RJ, Riedl M, Lee JH, Law PY, Loh HH, Elde R, Wessendorf MW. (1995) delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J Neurosci*, 15, 1215-1235.
- Baamonde A, Lastra A, Juarez L, Garcia V, Hidalgo A, Menendez L. (2005) Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372, 213-219.
- Barra D, Mignogna G, Simmaco M, Pucci P, Severini C, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Erspamer V. (1994) [D-Leu²]deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian hylid frog, *Phyllomedusa burmeisteri*. *Peptides*, 15, 199-202.

- Bassilana F, Champigny G, Waldmann R, de Weille JR, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997) The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties. *J Biol Chem*, 272, 28819-28822.
- Beaudry H, Dubois D, Gendron L. (2011) Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. *J Neurosci*, 31, 13068-13077.
- Beaudry H, Proteau-Gagne A, Li S, Dory Y, Chavkin C, Gendron L. (2009) Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience*, 161, 381-391.
- Berrettoni B. (1986) Mechanisms of cancer metastasis to bone. *The Journal of bone and joint surgery. American Volume*, 308-312.
- Besse D, Lombard MC, Besson JM. (1991) Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial dorsal horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord. *Brain Res*, 548, 287-291.
- Bie B, Zhang Z, Cai YQ, Zhu W, Zhang Y, Dai J, Lowenstein CJ, Weinman EJ, Pan ZZ. (2010) Nerve growth factor-regulated emergence of functional delta-opioid receptors. *J Neurosci*, 30, 5617-5628.
- Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, Schultzberg M. (1988) Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*, 9, 165-171.
- Brainin-Mattos J, Smith ND, Malkmus S, Rew Y, Goodman M, Taulane J, Yaksh TL. (2006) Cancer-related bone pain is attenuated by a systemically available delta-opioid receptor agonist. *Pain*, 122, 174-181.
- Broom DC, Jutkiewicz EM, Folk JE, Traynor JR, Rice KC, Woods JH. (2002) Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. *Neuropsychopharmacology*, 26, 744-755.
- Bruera E. (1997) Neuropsychiatric toxicity of opioids. *Proceedings of the 8th World Congress on Pain: Progress in pain research and management*, 8, 717-738.
- Bruera E, Macmillan K, Hanson J, MacDonald RN. (1989) The cognitive effects of the administration of narcotic analgesics in patients with cancer pain. *Pain*, 39, 13-16.
- Brunton L CBA, Knollmann B.C. 2010. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.

- Bzdega T, Chin H, Kim H, Jung HH, Kozak CA, Klee WA. (1993) Regional expression and chromosomal localization of the delta opiate receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 9305-9309.
- Cahill CM, McClellan KA, Morinville A, Hoffert C, Hubatsch D, O'Donnell D, Beaudet A. (2001a) Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol*, 440, 65-84.
- Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, Beaudet A. (2003) Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain*, 101, 199-208.
- Cahill CM, Morinville A, Lee MC, Vincent JP, Collier B, Beaudet A. (2001b) Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci*, 21, 7598-7607.
- Cain DM, Wacnik PW, Eikmeier L, Beitz A, Wilcox GL, Simone DA. (2001) Functional interactions between tumor and peripheral nerve in a model of cancer pain in the mouse. *Pain Med*, 2, 15-23.
- Cairns BE et Gazerani P. (2009) Sex-related differences in pain. *Maturitas*, 63, 292-296.
- Campa JA, 3rd et Payne R. (1992) The management of intractable bone pain: a clinician's perspective. *Semin Nucl Med*, 22, 3-10.
- Campora E, Merlini L, Pace M, Bruzzone M, Luzzani M, Gottlieb A, Rosso R. (1991) The incidence of narcotic-induced emesis. *J Pain Symptom Manage*, 6, 428-430.
- Canon JR, Roudier M, Bryant R, Morony S, Stolina M, Kostenuik PJ, Dougall WC. (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.
- Caraceni A, et al. (2004) Breakthrough pain characteristics and syndromes in patients with cancer pain. An international survey. *Palliat Med*, 18, 177-183.
- Caraceni A et Portenoy RK. (1999) An international survey of cancer pain characteristics and syndromes. IASP Task Force on Cancer Pain. International Association for the Study of Pain. *Pain*, 82, 263-274.
- Carr DB, Goudas LC, Balk EM, Bloch R, Ioannidis JP, Lau J. (2004) Evidence report on the treatment of pain in cancer patients. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 23-31.

- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, 306-313.
- Chan JS, Lee JW, Ho MK, Wong YH. (2000) Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. *Mol Pharmacol*, 57, 700-708.
- Chang KJ, Rigdon GC, Howard JL, McNutt RW. (1993) A novel, potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86. *J Pharmacol Exp Ther*, 267, 852-857.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53, 55-63.
- Cheng PY, Svingos AL, Wang H, Clarke CL, Jenab S, Beczkowska IW, Inturrisi CE, Pickel VM. (1995) Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci*, 15, 5976-5988.
- Cherny N, Ripamonti C, Pereira J, Davis C, Fallon M, McQuay H, Mercadante S, Pasternak G, Ventafridda V. (2001) Strategies to manage the adverse effects of oral morphine: an evidence-based report. *J Clin Oncol*, 19, 2542-2554.
- Christo PJ et Mazloomdoost D. (2008) Cancer pain and analgesia. *Ann N Y Acad Sci*, 1138, 278-298.
- Chu LF, Clark DJ, Angst MS. (2006) Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study. *J Pain*, 7, 43-48.
- Cifuentes N, Pickren J.W. (1979) Metastases from carcinoma of mammary gland: An autopsy study. *J Surg Oncol*, 11, 191-199.
- Coleman RE. (1997) Skeletal complications of malignancy. *Cancer*, 80, 1588-1594.
- Coleman RE. (2006) Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*, 12, 6243s-6249s.
- Coleman RE. (2008) Risks and benefits of bisphosphonates. *Br J Cancer*, 98, 1736-1740.
- Coleman RE et Rubens RD. (1987) The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer*, 55, 61-66.

- Comer SD, Hoenicke EM, Sable AI, McNutt RW, Chang KJ, De Costa BR, Mosberg HI, Woods JH. (1993) Convulsive effects of systemic administration of the delta opioid agonist BW373U86 in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 267, 888-895.
- Dado RJ, Law PY, Loh HH, Elde R. (1993) Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. *Neuroreport*, 5, 341-344.
- Dashwood MR, Sykes RM, Thomson CS. (1990) Autoradiographic demonstration of [3H] loperamide binding to opioid receptors in rat and human small intestine. *Prog Clin Biol Res*, 328, 165-169.
- Davies A. (2005) Current thinking in cancer breakthrough pain management. *European Journal of Palliative Care*, 12 (Suppl.), 4-6.
- de Wit R, van Dam F, Litjens MJ, Abu-Saad HH. (2001) Assessment of pain cognitions in cancer patients with chronic pain. *J Pain Symptom Manage*, 22, 911-924.
- Debruyne D, Leroy A, O DEW, Vakaet L, Mareel M, Bracke M. (2010) Direct effects of delta opioid receptor agonists on invasion-associated activities of HCT-8/E11 colon cancer cells. *Anticancer Res*, 30, 9-17.
- Demeulenaere L, Verbeke S, Muls M, Reyntjens A. (1974) Loperamide: an open multicentre trial and double-blind cross-over comparison with placebo in patients with chronic diarrhoea. *Curr Ther Res Clin Exp*, 16, 32-39.
- Dixon WJ. (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 20, 441-462.
- Dixon WJ. (1991) Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev*, 15, 47-50.
- Dondio G. (2000) Development of novel pain relief agents acting through the selective activation of the delta-opioid receptor. *Farmacologia*, 55, 178-180.
- 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.
- Donthineni R. (2009) Diagnosis and staging of spine tumors. *Orthop Clin North Am*, 40, 1-7, v.
- Dore-Savard L, et al. (2010) Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS One*, 5, e13774.

- Drake MT, Clarke BL, Khosla S. (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*, 83, 1032-1045.
- Dy SM, Asch SM, Naeim A, Sanati H, Walling A, Lorenz KA. (2008) Evidence-based standards for cancer pain management. *J Clin Oncol*, 26, 3879-3885.
- Dykstra LA, Schoenbaum GM, Yarbrough J, McNutt R, Chang KJ. (1993) A novel delta opioid agonist, BW373U86, in squirrel monkeys responding under a schedule of shock titration. *J Pharmacol Exp Ther*, 267, 875-882.
- Eisenberg E, Berkey CS, Carr DB, Mosteller F, Chalmers TC. (1994) Efficacy and safety of nonsteroidal antiinflammatory drugs for cancer pain: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 12, 2756-2765.
- Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Corsi R, Severini C, Barra D, Simmaco M, Kreil G. (1989) Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 5188-5192.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258, 1952-1955.
- Ferrell BR, Juarez G, Borneman T. (1999) Use of routine and breakthrough analgesia in home care. *Oncol Nurs Forum*, 26, 1655-1661.
- Filliol D, et al. (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet*, 25, 195-200.
- Fine PG et Busch MA. (1998) Characterization of breakthrough pain by hospice patients and their caregivers. *J Pain Symptom Manage*, 16, 179-183.
- Foley K. (1991) Clinical tolerance to opioids. *Towards a new pharmacotherapy of pain*, 181-203.
- Foss JF. (2001) A review of the potential role of methylnaltrexone in opioid bowel dysfunction. *Am J Surg*, 182, 19S-26S.
- Fraser GL, Gaudreau GA, Clarke PB, Menard DP, Perkins MN. (2000a) Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br J Pharmacol*, 129, 1668-1672.
- Fraser GL, Pradhan AA, Clarke PB, Wahlestedt C. (2000b) Supraspinal antinociceptive response to [D-Pen(2,5)]-enkephalin (DPDPE) is pharmacologically distinct from that to other delta-agonists in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 1135-1141.

- Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K. (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem*, 67, 1309-1316.
- Galasko CS. (1986) Skeletal metastases. *Clin Orthop Relat Res*, 18-30.
- Gardell LR, Wang R, Burgess SE, Ossipov MH, Vanderah TW, Malan TP, Jr., Lai J, Porreca F. (2002) Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. *J Neurosci*, 22, 6747-6755.
- Gaveriaux-Ruff C, Karchewski LA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL. (2008) Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci*, 27, 2558-2567.
- Gaveriaux-Ruff C et Kieffer BL. (2011) Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol*, 22, 405-414.
- Gendron L, Esdaile MJ, Mennicken F, Pan H, O'Donnell D, Vincent JP, Devi LA, Cahill CM, Stroh T, Beaudet A. (2007a) Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience*, 144, 263-274.
- Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, O'Donnell D, Vincent JP, Stroh T, Beaudet A. (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci*, 26, 953-962.
- Gendron L, Pintar JE, Chavkin C. (2007b) Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience*, 150, 807-817.
- Ghilardi JR, et al. (2005) Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci*, 25, 3126-3131.
- Gosselin RD, Dansereau MA, Pohl M, Kitabgi P, Beaudet N, Sarret P, Melik Parsadaniantz S. (2008) Chemokine network in the nervous system: a new target for pain relief. *Curr Med Chem*, 15, 2866-2875.
- Griffiths JR. (1991) Are cancer cells acidic? *Br J Cancer*, 64, 425-427.
- Guan JS, et al. (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell*, 122, 619-631.
- Guise TA, et al. (2006) Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res*, 12, 6213s-6216s.

- Gulya K, Gehlert DR, Wamsley JK, Mosberg H, Hruby VJ, Yamamura HI. (1986) Light microscopic autoradiographic localization of delta opioid receptors in the rat brain using a highly selective bis-penicillamine cyclic enkephalin analog. *J Pharmacol Exp Ther*, 238, 720-726.
- Halvorson KG, Kubota K, Sevcik MA, Lindsay TH, Sotillo JE, Ghilardi JR, Rosol TJ, Boustany L, Shelton DL, Mantyh PW. (2005) A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone. *Cancer Res*, 65, 9426-9435.
- 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.
- Harada Y. (1975) Induction of metastasizing carcinoma in rats and their biological characteristics. *Acta Pathol Jpn*, 25, 451-461.
- Heyman JS, Mulvaney SA, Mosberg HI, Porreca F. (1987) Opioid delta-receptor involvement in supraspinal and spinal antinociception in mice. *Brain Res*, 420, 100-108.
- Holdridge SV et Cahill CM. (2007) Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain*, 11, 685-693.
- Honda CN et Arvidsson U. (1995) Immunohistochemical localization of delta- and mu-opioid receptors in primate spinal cord. *Neuroreport*, 6, 1025-1028.
- Honore P, Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, O'Keefe P F, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. (2000a) Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med*, 6, 521-528.
- Honore P et Mantyh PW. (2000) Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain Med*, 1, 303-309.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW. (2000b) Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*, 98, 585-598.
- Honore P, Schwei J, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. (2000c) Cellular and neurochemical remodeling of the spinal cord in bone cancer pain. *Prog Brain Res*, 129, 389-397.

- Hortobagyi GN, et al. (1998) Long-term prevention of skeletal complications of metastatic breast cancer with pamidronate. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 16, 2038-2044.
- Hoskin PJ, Yarnold JR, Roos DR, Bentzen S. (2001) Radiotherapy for bone metastases. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 13, 88-90.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258, 577-580.
- Hurley RW et Hammond DL. (2000) The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci*, 20, 1249-1259.
- Hurley RW et Hammond DL. (2001) Contribution of endogenous enkephalins to the enhanced analgesic effects of supraspinal mu opioid receptor agonists after inflammatory injury. *J Neurosci*, 21, 2536-2545.
- Hutcheson DM, Matthes HW, Valjent E, Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Diaz M, Garzon J, Kieffer BL, Maldonado R. (2001) Lack of dependence and rewarding effects of deltorphin II in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 13, 153-161.
- Improta G et Broccardo M. (1992) Spinal antinociceptive effects of [D-Ala²]deltorphin II, a novel and highly selective delta-opioid receptor agonist. *Peptides*, 13, 1123-1126.
- Jaglowski JR, Zagon IS, Stack BC, Jr., Verderame MF, Leure-duPree AE, Manning JD, McLaughlin PJ. (2005) Opioid growth factor enhances tumor growth inhibition and increases the survival of paclitaxel-treated mice with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56, 97-104.
- James S, Hoyle CH, Burnstock G, Jass JR, Jeffrey IJ, Lennard-Jones JE. (1987) Autoradiographic localization of delta-opioid binding sites in human sigmoid colon. *Eur J Pharmacol*, 142, 185-186.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-249.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hokfelt T. (1995) Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci*, 15, 8156-8166.

- Jiang Q, Mosberg HI, Porreca F. (1990) Modulation of the analgesic efficacy and potency of morphine by [D-Pen2, D-Pen5]enkephalin in mice. *Prog Clin Biol Res*, 328, 449-452.
- Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA. (1992) Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol*, 42, 1083-1089.
- Julius D et Basbaum AI. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203-210.
- Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR, Woods JH. (2005) Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 182, 588-596.
- Kakonen SM et Mundy GR. (2003) Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer*, 97, 834-839.
- Kalra A, Urban MO, Sluka KA. (2001) Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *J Pharmacol Exp Ther*, 298, 257-263.
- Kane BE, Svensson B, Ferguson DM. (2006) Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J*, 8, E126-137.
- Kest B, Lee CE, McLemore GL, Inturrisi CE. (1996) An antisense oligodeoxynucleotide to the delta opioid receptor (DOR-1) inhibits morphine tolerance and acute dependence in mice. *Brain Res Bull*, 39, 185-188.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12048-12052.
- Kieffer BL et Evans CJ. (2002) Opioid tolerance-in search of the holy grail. *Cell*, 108, 587-590.
- King T, et al. (2005) Role of NK-1 neurotransmission in opioid-induced hyperalgesia. *Pain*, 116, 276-288.
- King T, Vardanyan A, Majuta L, Melemedjian O, Nagle R, Cress AE, Vanderah TW, Lai J, Porreca F. (2007) Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. *Pain*, 132, 154-168.
- Kirou-Mauro AM, Hird A, Wong J, Sinclair E, Barnes EA, Tsao M, Danjoux C, Chow E. (2009) Has pain management in cancer patients with bone metastases improved?

A seven-year review at an outpatient palliative radiotherapy clinic. *J Pain Symptom Manage*, 37, 77-84.

- Knapp RJ, et al. (1994) Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci*, 54, PL463-469.
- Kondo I, Marvizon JC, Song B, Salgado F, Codeluppi S, Hua XY, Yaksh TL. (2005) Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J Neurosci*, 25, 3651-3660.
- Kozlow W et Guise TA. (2005) Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10, 169-180.
- Krames ES, Wilkie DJ, Gershow J. (1986) Intrathecal D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin (DADL) restores analgesia in a patient analgetically tolerant to intrathecal morphine sulfate. *Pain*, 24, 205-209.
- Krempien R, Niethammer A, Harms W, Debus J. (2005) Bisphosphonates and bone metastases: current status and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther*, 5, 295-305.
- Kuniyasu H, Luo Y, Fujii K, Sasahira T, Moriwaka Y, Tatsumoto N, Sasaki T, Yamashita Y, Ohmori H. (2010) CD10 enhances metastasis of colorectal cancer by abrogating the anti-tumoural effect of methionine-enkephalin in the liver. *Gut*, 59, 348-356.
- Law PY, McGinn TM, Campbell KM, Erickson LE, Loh HH. (1997) Agonist activation of delta-opioid receptor but not mu-opioid receptor potentiates fetal calf serum or tyrosine kinase receptor-mediated cell proliferation in a cell-line-specific manner. *Mol Pharmacol*, 51, 152-160.
- Lee YT. (1983) Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol*, 23, 175-180.
- Lee YW, Chaplan SR, Yaksh TL. (1995) Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model. *Neurosci Lett*, 199, 111-114.
- Lewis RV, Stern AS, Kimura S, Rossier J, Stein S, Udenfriend S. (1980) An about 50,000-dalton protein in adrenal medulla: a common precursor of [Met]- and [Leu]enkephalin. *Science*, 208, 1459-1461.
- Lipton A. (2006) Future treatment of bone metastases. *Clin Cancer Res*, 12, 6305s-6308s.

- Lipton A. (2008) Emerging role of bisphosphonates in the clinic--antitumor activity and prevention of metastasis to bone. *Cancer Treat Rev*, 34 Suppl 1, S25-30.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*, 267, 495-499.
- Luger NM, Honore P, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, Clohisy DR, Mantyh PW. (2001) Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Res*, 61, 4038-4047.
- Luger NM, 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.
- Mach DB, et al. (2002) Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*, 113, 155-166.
- Major PP, Lipton A, Berenson J, Hortobagyi G. (2000) Oral bisphosphonates: A review of clinical use in patients with bone metastases. *Cancer*, 88, 6-14.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*, 18, 22-29.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 350, 412-438.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. (1988) Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci*, 11, 308-314.
- Mantyh PW. (2006) Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nat Rev Neurosci*, 7, 797-809.
- Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. (2002) Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer*, 2, 201-209.
- Mao-Ying QL, Zhao J, Dong ZQ, Wang J, Yu J, Yan MF, Zhang YQ, Wu GC, Wang YQ. (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.
- Mao J. (2009) Translational pain research: achievements and challenges. *J Pain*, 10, 1001-1011.

- Martin-Kleiner I, Gabrilovac J, Kusec R, Boranic M. (2003) Methionine enkephalin suppresses metabolic activity of a leukemic cell line (NALM-1) and enhances CD10 expression. *Int Immunopharmacol*, 3, 707-711.
- Martin CD, Jimenez-Andrade JM, Ghilardi JR, Mantyh PW. (2007) Organization of a unique net-like meshwork of CGRP+ sensory fibers in the mouse periosteum: implications for the generation and maintenance of bone fracture pain. *Neurosci Lett*, 427, 148-152.
- Martin M, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL. (2003) Acute antinociceptive responses in single and combinatorial opioid receptor knockout mice: distinct mu, delta and kappa tones. *Eur J Neurosci*, 17, 701-708.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*, 197, 517-532.
- Maslov LN, Krylatov AV, Lishmanov Iu B. (1996) [Participation of endogenous mu- and delta-opiate receptor agonists in mechanisms of the anti-arrhythmia effect of adaptation]. *Biull Eksp Biol Med*, 121, 24-25.
- May CN, Dashwood MR, Whitehead CJ, Mathias CJ. (1989) Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution. *Br J Pharmacol*, 98, 903-913.
- Mayfield KP et D'Alecy LG. (1992) Role of endogenous opioid peptides in the acute adaptation to hypoxia. *Brain Res*, 582, 226-231.
- McCarthy PW et Lawson SN. (1989) Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience*, 28, 745-753.
- McNicol E, Strassels S, Goudas L, Lau J, Carr D. (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, alone or combined with opioids, for cancer pain: a systematic review. *J Clin Oncol*, 22, 1975-1992.
- McQuay H. (1999) Opioids in pain management. *Lancet*, 353, 2229-2232.
- Medhurst SJ, et al. (2002) A rat model of bone cancer pain. *Pain*, 96, 129-140.
- Mennicken F, Zhang J, Hoffert C, Ahmad S, Beaudet A, O'Donnell D. (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, 465, 349-360.

- Mercadante S. (1997) Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain*, 69, 1-18.
- Mercadante S. (2010) Intravenous morphine for management of cancer pain. *Lancet Oncol*, 11, 484-489.
- Mercadante S et Arcuri E. (1998) Breakthrough pain in cancer patients: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev*, 24, 425-432.
- Mercadante S, Ferrera P, Villari P, Arcuri E. (2003) Hyperalgesia: an emerging iatrogenic syndrome. *J Pain Symptom Manage*, 26, 769-775.
- Mercadante S et Fulfaro F. (2007) Management of painful bone metastases. *Curr Opin Oncol*, 19, 308-314.
- Mercadante S et Portenoy RK. (2001) Opioid poorly-responsive cancer pain. Part 3. Clinical strategies to improve opioid responsiveness. *J Pain Symptom Manage*, 21, 338-354.
- 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.
- Mercadante S, Villari P, Ferrera P, Casuccio A. (2004) Optimization of opioid therapy for preventing incident pain associated with bone metastases. *J Pain Symptom Manage*, 28, 505-510.
- Meuser T, Pietruck C, Radbruch L, Stute P, Lehmann KA, Grond S. (2001) Symptoms during cancer pain treatment following WHO-guidelines: a longitudinal follow-up study of symptom prevalence, severity and etiology. *Pain*, 93, 247-257.
- Mika J, Przewlocki R, Przewlocka B. (2001) The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 415, 31-37.
- Minami M, Maekawa K, Yabuuchi K, Satoh M. (1995) Double in situ hybridization study on coexistence of mu-, delta- and kappa-opioid receptor mRNAs with preprotachykinin A mRNA in the rat dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res*, 30, 203-210.
- Mogil JS. (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*, 10, 283-294.
- Montecucchi PC, de Castiglione R, Piani S, Gozzini L, Erspamer V. (1981) Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res*, 17, 275-283.

- Morinville A, et al. (2004a) Morphine-induced changes in delta opioid receptor trafficking are linked to somatosensory processing in the rat spinal cord. *J Neurosci*, 24, 5549-5559.
- Morinville A, Cahill CM, Esdaile MJ, Aibak H, Collier B, Kieffer BL, Beaudet A. (2003) Regulation of delta-opioid receptor trafficking via mu-opioid receptor stimulation: evidence from mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci*, 23, 4888-4898.
- Morinville A, Cahill CM, Kieffer B, Collier B, Beaudet A. (2004b) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain*, 109, 266-273.
- Mosberg HI, Hurst R, Hruba VJ, Galligan JJ, Burks TF, Gee K, Yamamura HI. (1983) Conformationally constrained cyclic enkephalin analogs with pronounced delta opioid receptor agonist selectivity. *Life Sci*, 32, 2565-2569.
- Moulin DE, Max MB, Kaiko RF, Inturrisi CE, Maggard J, Yaksh TL, Foley KM. (1985) The analgesic efficacy of intrathecal D-Ala2-D-Leu5-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain*, 23, 213-221.
- Nadal X, Banos JE, Kieffer BL, Maldonado R. (2006) Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci*, 23, 830-834.
- 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.
- Narita M, Funada M, Suzuki T. (2001) Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Ther*, 89, 1-15.
- Narita M et Tseng LF. (1995) Stimulation of spinal delta-opioid receptors in mice selectively enhances the attenuation of delta-opioid receptor-mediated antinociception by antisense oligodeoxynucleotide. *Eur J Pharmacol*, 284, 185-189.
- Nazarian A, Gu G, Gracias NG, Wilkinson K, Hua XY, Vasko MR, Yaksh TL. (2008) Spinal N-methyl-D-aspartate receptors and nociception-evoked release of primary afferent substance P. *Neuroscience*, 152, 119-127.
- Negri L, Improta G, Lattanzi R, Potenza RL, Luchetti F, Melchiorri P. (1995) Interaction between the mu-agonist dermorphin and the delta-agonist [D-Ala2, Glu4]deltorphin in supraspinal antinociception and delta-opioid receptor binding. *Br J Pharmacol*, 116, 2931-2938.

- Negus SS, Butelman ER, Chang KJ, DeCosta B, Winger G, Woods JH. (1994) Behavioral effects of the systemically active delta opioid agonist BW373U86 in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 270, 1025-1034.
- Nichols ML, Bian D, Ossipov MH, Lai J, Porreca F. (1995) Regulation of morphine antiallodynic efficacy by cholecystinin in a model of neuropathic pain in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 1339-1345.
- Nielsen OS, Munro AJ, Tannock IF. (1991) Bone metastases: pathophysiology and management policy. *J Clin Oncol*, 9, 509-524.
- Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Furuse S, Namiki A. (2009) SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth*, 102, 251-258.
- Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Omote K, Namiki A. (2007) Bone cancer increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 148, 560-572.
- Nishimura E, Buchan AM, McIntosh CH. (1986) Autoradiographic localization of mu- and delta-type opioid receptors in the gastrointestinal tract of the rat and guinea pig. *Gastroenterology*, 91, 1084-1094.
- Olson TH, Riedl MS, Vulchanova L, Ortiz-Gonzalez XR, Elde R. (1998) An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport*, 9, 1109-1113.
- OMS OMDIS. (1996) Échelle de la douleur en 3 étapes.
- Onofrio BM et Yaksh TL. (1983) Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet*, 1, 1386-1387.
- Ossipov MH, Lai J, King T, Vanderah TW, Porreca F. (2005) Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Biopolymers*, 80, 319-324.
- Otis V, Sarret P, Gendron L. (2011) Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone pain. *Neuroscience*, 183, 221-229.
- Paget S. (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 8, 98-101.
- Parrott T. (1999) Using opioid analgesics to manage chronic noncancer pain in primary care. *J Am Board Fam Pract*, 12, 293-306.

- Pert CB et Snyder SH. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, 179, 1011-1014.
- Petrillo P, et al. (2003a) Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8aalpha,8abeta, 12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 1079-1089.
- Petrillo P, et al. (2003b) Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8aalpha,8abeta, 12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 1079-1089.
- Petzke F, Radbruch L, Zech D, Loick G, Grond S. (1999) Temporal presentation of chronic cancer pain: transitory pains on admission to a multidisciplinary pain clinic. *J Pain Symptom Manage*, 17, 391-401.
- Pfeiffer A et Herz A. (1982) Mixed type inhibition of [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin binding to mu-opiate binding sites by mu-, but not by kappa-opiate ligands. *Eur J Pharmacol*, 77, 359-361.
- Porreca F, Heyman JS, Mosberg HI, Omnaas JR, Vaught JL. (1987) Role of mu and delta receptors in the supraspinal and spinal analgesic effects of [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 241, 393-400.
- Porreca F, Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Burks TF. (1984) Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 230, 341-348.
- Portenoy RK. (1997) Treatment of temporal variations in chronic cancer pain. *Semin Oncol*, 24, S16-17-12.
- Portenoy RK et Frager G. (1999) Pain management: pharmacological approaches. *Cancer Treat Res*, 100, 1-29.
- Portenoy RK et Hagen NA. (1990) Breakthrough pain: definition, prevalence and characteristics. *Pain*, 41, 273-281.
- Portenoy RK et Lesage P. (1999) Management of cancer pain. *Lancet*, 353, 1695-1700.

- Portenoy RK, Payne D, Jacobsen P. (1999) Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. *Pain*, 81, 129-134.
- Portoghese PS, Sultana M, Nagase H, Takemori AE. (1992) A highly selective delta 1-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur J Pharmacol*, 218, 195-196.
- Portoghese PS, Sultana M, Takemori AE. (1988) Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 146, 185-186.
- Powell KJ, Ma W, Sutak M, Doods H, Quirion R, Jhamandas K. (2000) Blockade and reversal of spinal morphine tolerance by peptide and non-peptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonists. *Br J Pharmacol*, 131, 875-884.
- Rice AS, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, Mogil JS, Stohr T. (2008) Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain*, 139, 243-247.
- Roos DE, O'Brien PC, Smith JG, Spry NA, Hoskin PJ, Burmeister BH, Turner SL, Bernshaw DM. (2000) A role for radiotherapy in neuropathic bone pain: preliminary response rates from a prospective trial (Trans-tasman radiation oncology group, TROG 96.05). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 46, 975-981.
- 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, 58-64.
- Ruiz-Garcia V et Lopez-Briz E. (2008) Morphine remains gold standard in breakthrough cancer pain. *BMJ*, 337, a3104.
- Saarto T, Janes R, Tenhunen M, Kouri M. (2002) Palliative radiotherapy in the treatment of skeletal metastases. *Eur J Pain*, 6, 323-330.
- Sabino MA, Luger NM, Mach DB, Rogers SD, Schwei MJ, Mantyh PW. (2003) Different tumors in bone each give rise to a distinct pattern of skeletal destruction, bone cancer-related pain behaviors and neurochemical changes in the central nervous system. *Int J Cancer*, 104, 550-558.
- Schafers M et Sorkin L. (2008) Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett*, 437, 188-193.
- Schiller PW, Nguyen TM, Weltrowska G, Wilkes BC, Marsden BJ, Lemieux C, Chung NN. (1992a) Differential stereochemical requirements of mu vs. delta opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of

- potent and highly delta-selective peptide antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 11871-11875.
- Schiller PW, Weltrowska G, Nguyen TM, Wilkes BC, Chung NN, Lemieux C. (1992b) Conformationally restricted deltorphin analogues. *J Med Chem*, 35, 3956-3961.
- Schulman KL et Kohles J. (2007) Economic burden of metastatic bone disease in the U.S. *Cancer*, 109, 2334-2342.
- Schultz JE et Gross GJ. (2001) Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther*, 89, 123-137.
- Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci*, 19, 10886-10897.
- 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, 128-141.
- Sevcik MA, Jonas BM, Lindsay TH, Halvorson KG, Ghilardi JR, Kuskowski MA, Mukherjee P, Maggio JE, Mantyh PW. (2006) Endogenous opioids inhibit early-stage pancreatic pain in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 131, 900-910.
- Silverman SM. (2009) Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner. *Pain Physician*, 12, 679-684.
- Simonet WS, et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319.
- Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Matthes H, Nappey V, Lannes B, Micheletti G, Kieffer B. (1994) The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol*, 46, 1015-1021.
- Slatkin NE. (2009) Opioid switching and rotation in primary care: implementation and clinical utility. *Curr Med Res Opin*, 25, 2133-2150.
- Sommer C et Kress M. (2004) Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361, 184-187.
- Statistique Canada S. (2011) Statistiques canadiennes sur le cancer. 2011. *Société canadienne du cancer et Statistique Canada*, 1-4.

- Stewart PE et Hammond DL. (1993) Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic[D-Pen2, D-Pen5] enkephalin and [D-Ala2, Glu4]deltorphin. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 820-828.
- Stewart PE et Hammond DL. (1994) Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 701-708.
- Sutherland SP, Cook SP, McCleskey EW. (2000) Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia. *Prog Brain Res*, 129, 21-38.
- Szczesny G. (2002) Molecular aspects of bone healing and remodeling. *Pol J Pathol*, 53, 145-153.
- Tabarowski Z, Gibson-Berry K, Felten SY. (1996) Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem*, 98, 453-457.
- Theriault RL et Hortobagyi GN. (1992) Bone metastasis in breast cancer. *Anticancer Drugs*, 3, 455-462.
- Troen BR. (2003) Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol*, 38, 605-614.
- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K. (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.
- Tubiana-Hulin M. (1991) Incidence, prevalence and distribution of bone metastases. *Bone*, 12 Suppl 1, S9-10.
- Urch C. (2004) The pathophysiology of cancer-induced bone pain: current understanding. *Palliat Med*, 18, 267-274.
- 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.
- 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.
- van den Beuken-van Everdingen MH, de Rijke JM, Kessels AG, Schouten HC, van Kleef M, Patijn J. (2007) Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. *Ann Oncol*, 18, 1437-1449.

- Vanderah T, Takemori AE, Sultana M, Portoghese PS, Mosberg HI, Hruby VJ, Haaseth RC, Matsunaga TO, Porreca F. (1994) Interaction of [D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin and [D-Ala²,Glu⁴]deltorphin with delta-opioid receptor subtypes in vivo. *Eur J Pharmacol*, 252, 133-137.
- Ventura C, Bastagli L, Bernardi P, Caldarera CM, Guarnieri C. (1989) Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol. *Biochim Biophys Acta*, 987, 69-74.
- Vierck CJ, Hansson PT, Yezienski RP. (2008) Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain*, 135, 7-10.
- von Moos R, Strasser F, Gillessen S, Zaugg K. (2008) Metastatic bone pain: treatment options with an emphasis on bisphosphonates. *Support Care Cancer*, 16, 1105-1115.
- Von Roenn JH, Cleeland CS, Gonin R, Hatfield AK, Pandya KJ. (1993) Physician attitudes and practice in cancer pain management. A survey from the Eastern Cooperative Oncology Group. *Ann Intern Med*, 119, 121-126.
- Wacnik PW, Kehl LJ, Trempe TM, Ramnaraine ML, Beitz AJ, Wilcox GL. (2003) Tumor implantation in mouse humerus evokes movement-related hyperalgesia exceeding that evoked by intramuscular carrageenan. *Pain*, 101, 175-186.
- 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, 219-229.
- Walsh TD. (1984) Opiates and respiratory function in advanced cancer. *Recent Results Cancer Res*, 89, 115-117.
- Walther HE. (1948) *Krebsmetastasen*, Switzerland: Bens Schwabe Verlag.
- Wang H et Wessendorf MW. (2001) Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol*, 429, 590-600.
- Ward SJ, Portoghese PS, Takemori AE. (1982) Improved assays for the assessment of kappa- and delta-properties of opioid ligands. *Eur J Pharmacol*, 85, 163-170.
- Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, Bian D, Vanderah TW, Malan TP, Jr., Porreca F. (1997) Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain*, 71, 57-64.
- Weiss L. (1992) Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis*, 10, 191-199.

- Yaksh TL. (1983) In vivo studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. I. Mu and delta receptor profiles in the primate. *J Pharmacol Exp Ther*, 226, 303-316.
- Yaksh TL. (1997) Pain after injury: some basic mechanisms. *J Fla Med Assoc*, 84, 16-19.
- Yamamoto J, Kawamata T, Niiyama Y, Omote K, Namiki A. (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, 843-853.
- Yamamoto T et Yaksh TL. (1992) Studies on the spinal interaction of morphine and the NMDA antagonist MK-801 on the hyperesthesia observed in a rat model of sciatic mononeuropathy. *Neurosci Lett*, 135, 67-70.
- Ye Y, Dang D, Viet CT, Dolan JC, Schmidt BL. (2012) Analgesia Targeting IB4-Positive Neurons in Cancer-Induced Mechanical Hypersensitivity. *J Pain*.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*, 386, 499-502.
- Zeppetella G. (2009) Impact and management of breakthrough pain in cancer. *Curr Opin Support Palliat Care*, 3, 1-6.
- Zeppetella G et Ribeiro MD. (2003) Pharmacotherapy of cancer-related episodic pain. *Expert Opin Pharmacother*, 4, 493-502.
- Zhang RX, Liu B, Wang L, Ren K, Qiao JT, Berman BM, Lao L. (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.
- Zhang WM, Jin WQ, Wong TM. (1996) Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol*, 28, 1547-1554.
- Zhang X, Bao L, Arvidsson U, Elde R, Hokfelt T. (1998) Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience*, 82, 1225-1242.
- Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, Unterwald E, Pasternak GW, Pintar JE. (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*, 24, 243-252.

Zimmerman DM et Leander JD. (1990) Selective opioid receptor agonists and antagonists: research tools and potential therapeutic agents. *J Med Chem*, 33, 895-902.

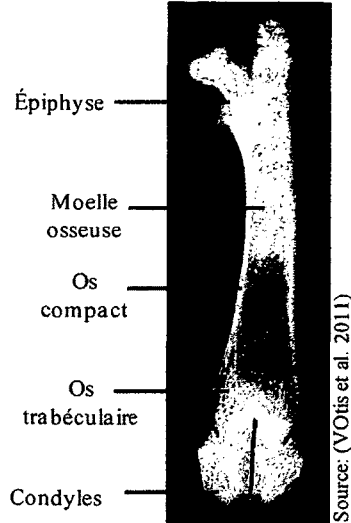
Zwolak P, Dudek AZ, Bodempudi VD, Nguyen J, Hebbel RP, Gallus NJ, Ericson ME, Goblirsch MJ, Clohisy DR. (2008) Local irradiation in combination with bevacizumab enhances radiation control of bone destruction and cancer-induced pain in a model of bone metastases. *Int J Cancer*, 122, 681-688.

10 ANNEXE

ANNEXE 1

Chirurgie

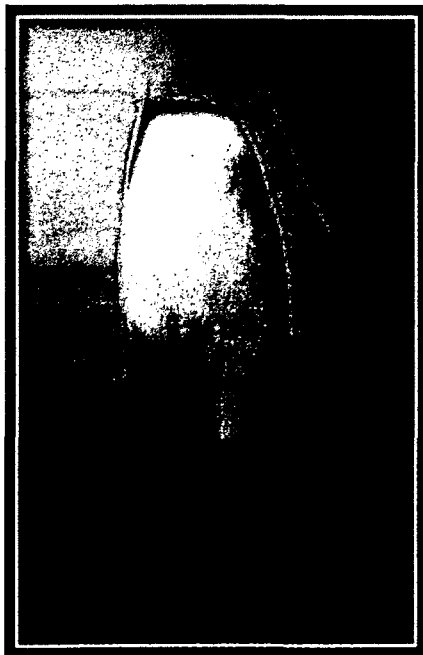
Fémur de rat naïf



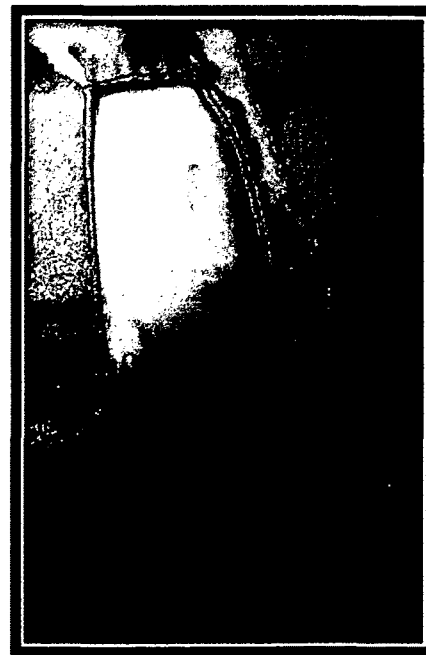
Site d'injection intercondylien



Étape 1



Étape 2

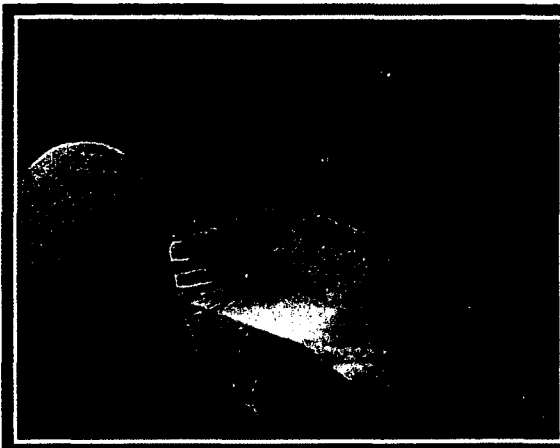


- Anesthésie : Isoflurane 5% et maintient à 2,5 %
- Placer le rat en décubitus dorsal
- Flexion patte postérieur gauche
- Désinfection zone

- Raser et désinfecter du site
- Incision de la peau (1,5 cm)
- Accès aux condyles

Chirurgie-Suite

Étape 3



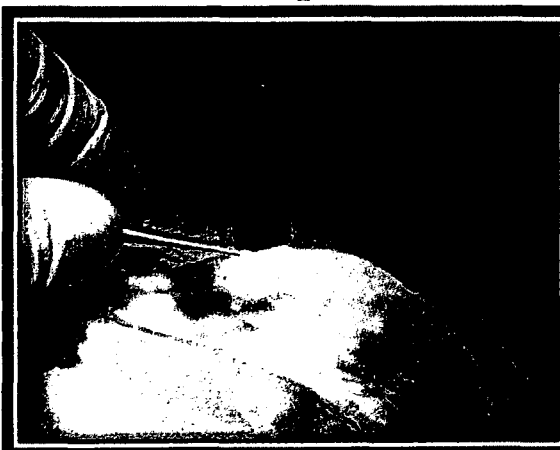
- Incision du quadriceps
- Accès aux condyles du fémur
- Creuser une cavité dans l'espace intercondylien

Étape 4



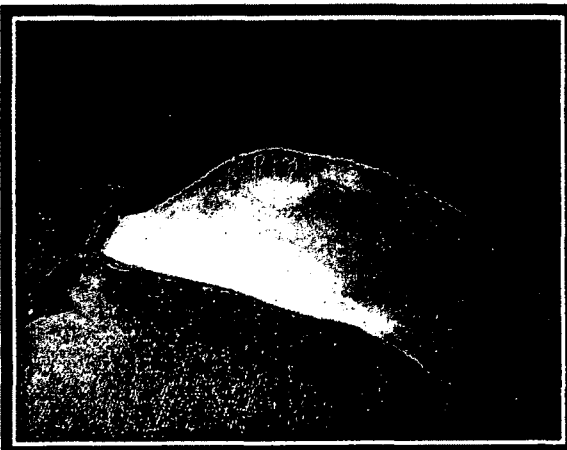
- Introduction aiguille 25 G 5/8
- Injection de 20 μ l MRMT-1 (30 000 cellules MRMT-1)

Étape 5



- Fermeture du site d'injection avec l'amalgame dentaire
- Lavage salin 0,9 %

Étape 6



- Points de sutures internes et externes

Durée de la chirurgie : 15 min