

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414)

**INSERM UMR_S U1119 Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et
Stratégies Thérapeutiques**

THÈSE présentée par :

Célia MATTA

Soutenue le : **20 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : Neurosciences

**Neuropathies induites par chimiothérapie néo-
adjuvante du cancer du sein : atteintes
périphériques et centrales, mécanismes impliqués
et perspectives thérapeutiques**

THÈSE dirigée par :

M. MENSAH-NYAGAN Ayikoé Guy

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. TROUSLARD Jérôme

Professeur, Institut de Neurosciences de la Timone

Mme. VITLART Odile

Maître de Conférences-HDR, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. MATHIS Chantal

Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

INVITÉ :

M. TALEB Omar

Chercheur CRHC, CNRS, Université de Strasbourg

Le chercheur et la puce

« Un chercheur travaille sur l'effet de l'amputation des pattes chez les puces. Pour cela, il arrache une première patte à une puce, et lui demande de sauter. Elle saute. Il arrache ensuite une seconde patte puis repose la question. La puce saute. Il continue d'arracher les pattes les unes après les autres jusqu'à la dernière patte. Il demande une ultime fois à la puce de sauter, mais celle-ci ne s'exécute pas. Le chercheur, fier de sa découverte, conclut que lorsque l'on arrache toutes les pattes à une puce, celle-ci devient sourde ! »

REMERCIEMENTS

Aucun travail ne s'accomplit dans la solitude. C'est pourquoi je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, le Pr. Mensah-Nyagan Ayikoé Guy, également directeur de l'Unité UMR_S INSERM 1119. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son Unité, et de m'avoir confié la réalisation de ce projet dont il m'a offert l'opportunité.

Mes remerciements vont également au Dr. Taleb Omar, qui m'encadre depuis mes débuts en master. Merci pour son aide et ses conseils durant toute cette période.

Je remercie profondément le Pr. Trouslard Jérôme, le Dr. Viltart Odile et le Dr. Mathis Chantal, rapporteurs de cette thèse, pour leur participation au jury. Merci pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce travail, et de l'avoir enrichi par leurs propositions.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les autres personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail :

Tout d'abord un grand merci à tous les membres de l'UMR_S INSERM 1119 que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années, et dont j'ai beaucoup appris.

Pour leurs encouragements et leur assistance, aussi bien matérielle que morale, qui m'ont permis de faire cette thèse, je remercie chaleureusement ma famille, mes proches et mes amis. Un grand merci à Susana Brun (« comme la couleur marron ») et Claudia de Tapia, deux femmes extraordinaires et fortes, qui ont été mes deux complices dans cette aventure. On a beau passer l'essentiel de sa journée avec ses collègues, la plupart d'entre eux restent pour nous des inconnus. Je suis heureuse que cela ne soit pas notre cas, et qu'aujourd'hui nous sommes bien plus que des collègues. Je tiens à vous remercier chaleureusement pour votre générosité et votre gentillesse, pour tous nos moments de complicité et de rigolade, mais aussi

pour votre écoute et votre soutien infaillible. Un remerciement spécial pour Claudia, qui comme Lucky Luck pose des cathéters plus vite que son ombre : tu as été non seulement ma partenaire de bureau, mais également mon binôme et une aide précieuse pour les tests comportementaux et les différentes manips biochimiques. Je te remercie d'avoir contribué à ces résultats, et d'avoir toujours été présente, toi et ta bonne humeur quotidienne. Et enfin les filles, merci de m'avoir toujours ouvert les bras !

Mes remerciements sincères vont également à Kevin Bigaut et Valérie Jolivel. Je vous remercie pour ce que vous m'avez donné, pour tous vos conseils et nos discussions, pour nos pauses déjeuners et pour votre soutien durant toute cette période.

Je tiens ensuite à remercier infiniment mes amis, vous êtes des personnes tout simplement géniales : un énorme merci à Benjamin, Carine, Lionel, Marion, ma petite Cléa, Jeff, Cyril, PJ, Hugues, Jordan (ou Jojo pour les intimes) et Clément, vous m'avez apporté l'aide dont j'avais besoin. Merci pour le temps que vous m'avez consacré, pour les conseils avisés, et surtout pour tous les bons moments partagés ! Merci pour votre présence chaleureuse et constamment bienveillante. Vous êtes des amours « mes chouchou », et comme on dit : « Les amis sont la famille que l'on choisit ».

Enfin, et pas des moindres, je tiens à remercier avec tout mon amour ma famille, dont les racines sont solides. Contrairement aux amis, on ne choisit pas sa famille, mais je peux dire que je suis née dans le bon nid ! Plus qu'un soutien, vous m'avez porté jusqu'à l'arrivée. Merci pour vos encouragements, pour votre amour sans condition et votre soutien constant. Vous m'avez accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de cette thèse, ainsi que dans ma vie personnelle. Vous êtes mes essentiels.

Papa, maman, qu'il est difficile de trouver les mots pour vous dire à quel point vous êtes des parents formidables. Vous m'avez offert la vie et vu grandir de jour en jour. Vous

avez fait de moi l'enfant le plus heureux, jusqu'à être une jeune femme épanouie et bien dans ses baskets. Merci de m'avoir guidé tout au long de ma vie par votre amour et votre expérience. Vous êtes ma source de tendresse ; je vous aime à l'infini, « de la Terre à la lune aller-retour » !

Gaël et Raphaël, mes deux frères chéris que j'aime, merci de faire partie de ma vie. Merci à Gaël pour ta philosophie de vie, pour ta force et la protection que tu m'apportes. Merci Raphaël pour ta maturité à seulement 15 ans, pour ta personnalité vive et engageante, et pour ta force tranquille. Je suis heureuse de partager une relation si unique avec mes frères, nous sommes soudés et unis. Mes chouchous, merci pour m'avoir tout donné durant cette épreuve, ainsi que dans ma vie.

Jessica, bien plus qu'une sœur, tu es ma meilleure amie, ma confidente. Bien plus que cela, tu es mon premier amour, mon âme sœur. Merci d'être là, d'être toi, et merci pour cette complicité unique qui nous anime. Tu es une femme forte pour laquelle j'ai beaucoup d'estime et d'admiration. Tu occupes une place unique dans ma vie, tu es mon modèle, ma force, et sans toi je ne serai pas moi. Tu sais m'écouter, me rassurer, me donner du courage et me faire rire. Merci pour ta présence, ton soutien et pour ton amour inconditionnel. « Je serai avec toi jusqu'à mon dernier souffle », je t'aime ma grande sœur !

J'aimerai également remercier mon beau-frère, Fabien. Merci pour ta maladresse qui me fait tellement rire, pour l'oreille attentive que tu as su m'apporter, pour toutes les soirées jeux et les bons moments partagés, mais aussi pour le bonheur que tu apportes à ma sœur. Je suis heureuse que tu fasses partie de ma vie !

Merci également à mes beaux-parents, Jean-Luc et Chantal, vous êtes des gens extraordinaires. Papa et Maman Weil, mille merci de m'avoir accepté et intégré telle que je

suis dans votre famille. Merci de prendre soin de moi. Je ne vous le dis pas assez souvent, mais je vous aime profondément.

Enfin, je tiens à remercier l'homme de ma vie, Alexis. Grâce à toi je connais l'amour unique, celui avec un grand A. Je te remercie de m'aimer chaque jour comme tu le fais ; merci pour ton soutien, ton écoute, ta patience, ta tendresse et ta générosité. Je t'aime à la folie, chaque jour un peu plus. Tu me comble de bonheur au quotidien, et si je devais tenir tout le bonheur du monde dans ma main, je tiendrais la tienne.

A toutes ces personnes : cette thèse est la nôtre.

SOMMAIRE

LISTE des FIGURES	1
LISTE des TABLEAUX	5
LISTE des principales ABREVIATIONS	6
RESUME de la THESE	9
ABSTRACT	19
INTRODUCTION.....	20
I/ Les Neuropathies	21
I.1. Sémiologie générale des neuropathies	21
I.2. Classification des neuropathies et étiologies.....	23
I.3. Diagnostic et évaluation clinique	26
I.3.1. Anamnèse – Interrogatoire	27
I.3.2. Examen clinique	28
I.3.3. Examens complémentaires : tests neurophysiologiques et autres méthodes quantitatives	31
II/ Neuropathie et atteintes centrales chimio-induites.....	33
II.1. Incidence et sémiologie des troubles neurologiques chimio-induits	34
II.1.1 Chimiothérapie et système nerveux périphérique : les neuropathies chimio-induites	34
II.1.1.1. Incidence.....	34
II.1.1.2. Sémiologie	36
II.1.2 Chimiothérapie et système nerveux central : syndrome du <i>chemobrain</i>	37
II.1.2.1. Incidence.....	37
II.1.2.2. Sémiologie et processus neurobiologiques altérés par la chimiothérapie	38
II.1.2.3. Evaluation clinique des atteintes cognitives chimio-induites.....	41
II.2. Physiopathologie des troubles du système nerveux chimio-induits	44
II.2.1. Physiopathologie des atteintes périphériques.....	45
II.2.1.1 Troubles sensoriels par hyperexcitabilité nerveuse : modifications de l'activité et/ou de l'expression de récepteurs canaux en périphérie	46
II.2.1.2 Troubles sensoriels par augmentation du message nociceptif au niveau spinal : modifications de la neurotransmission.....	51
II.2.1.3 Toxicité cellulaires et modifications intracellulaires suite à la chimiothérapie.....	54
II.2.1.4 Processus inflammatoires : dommages, sensibilisation et douleur.....	58

II.2.1.4.1 Les acteurs de la neuro-inflammation.....	59
II.2.1.4.2 Les médiateurs de la neuro-inflammation : les cytokines et les chimiokines....	61
II.2.2. Processus physiopathologiques impliqués dans les atteintes centrales.....	64
II.2.2.1 La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	64
II.2.2.2 Toxicité des cellules cérébrales suite à la chimiothérapie.....	72
II.2.2.2.1 Cellules souches hippocampiques - Neurogenèse	73
II.2.2.2.2 Cellules progénitrices des oligodendrocytes et pathologie de la substance blanche.....	78
III/ Troubles neurologiques induits par la chimiothérapie néoadjuvante (CNA) du cancer du sein	81
III.1. La chimiothérapie néoadjuvante du cancer du sein.....	82
III.1.1. Principe et objectifs de la CNA	82
III.1.2. Bénéfices et réponse classique suite à la CNA	83
III.1.3. Traitements standards utilisés : thérapies séquentielles anthracyclines et taxanes.....	83
III.1.4. Toxicité et effets secondaires.....	85
III.2. Troubles neurologiques induits par la CNA.....	86
IV/ Prise en charge thérapeutique et inefficacité des traitements actuels contre les troubles neurologiques chimio-induits.....	88
IV.1. Présentation des traitements actuels et de leur inefficacité	88
IV.1.1 Prise en charge des neuropathies périphériques chimio-induites	88
IV.1.2 Prise en charge des troubles cognitifs induits par la chimiothérapie.....	95
IV.1.2.1 Prise en charge médicamenteuse.....	95
IV.1.2.2 Thérapies cognitivo-comportementales	96
V/ Développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre les troubles neurologiques chimio- induits.....	98
V.1. Modèles animaux disponibles pour la recherche préclinique : nécessité de caractériser un modèle animal de troubles neurologiques CNA-induits.....	99
V.2. Elaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques : utilisation de la Duloxétine.....	111
V.2.1. Généralités : indications et pharmacologie	111
V.2.2. Du dans le traitement des douleurs chroniques.....	113
V.2.2.1 DU et traitement des douleurs chroniques non associées à la chimiothérapie	113
V.2.2.2 DU et traitement des douleurs chroniques associées à la chimiothérapie.....	114
V.2.2.3 Mécanismes des propriétés analgésiques de la DU	117
V.2.3. Effets pro-cognitifs et neuroprotecteurs de la DU	120

V.2.4. Effets secondaires indésirables et contre-indications de la DU	123
V.3. Elaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques : utilisation de l'Allopregnanolone	124
HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	126
MATERIELS ET METHODES	131
I/ Animaux, conditions d'hébergements et déclarations éthiques.....	132
II/ Drogues et solubilisation	132
III/ Traitement animal	136
III.1. Démarche expérimentale des tests comportementaux.....	136
III.2. Démarche expérimentale des injections	139
III.2.1. Traitements thérapeutiques potentiels :	139
III.2.2 Chimiothérapie :.....	139
IV/ Analyses comportementales.....	139
IV.1. Evaluation de la sensibilité nociceptive par des tests nociceptifs	140
IV.1.1. Sensibilité mécanique : Test des filaments de von Frey.....	140
IV.1.2 Sensibilité thermique au froid : Test de la goutte à l'acétone.....	142
IV.2. Evaluation de la mémoire spatiale par le test du <i>spatial object recognition</i>	143
IV.3. Evaluation des capacités motrices par le test du Catwalk.....	148
V/ Identification du stade du cycle œstral par coloration cytologique.....	151
VI/ Etude de la perméabilité para-cellulaire de la barrière hémato-encéphalique : test du colorant bleu Evans (<i>Evans blue dye Assay</i>)	153
VII/ Analyse de la conduction nerveuse par enregistrements électrophysiologiques.....	158
VIII/ Détection de protéines au sein des tissus par immunohistochimie fluorescente	159
IX/ Détection de la protéine NF200 dans le nerf sciatique par western blot	161
X/ Dosage de la concentration sérique de cytokines par cytométrie en flux	162
XI/ Analyses statistiques	166
RESULTATS.....	167
I/ Caractérisation du modèle	168
I.1. Effet de la CNA sur le poids des animaux	168
I.2 Effet de la CNA sur les capacités locomotrices	169
I.3. Effet de la CNA sur le système nerveux périphérique	173
I.3.1. Effet de la CNA sur la sensibilité nociceptive.....	173
I.3.1.1. Evaluation de l'allodynie et de l'hyperalgie mécanique.....	173

I.3.1.2. Evaluation de l'allodynie thermique au froid	174
I.3.2. Altérations morpho-fonctionnelles du nerf sciatique induites par la CNA	174
I.3.2.1. Evaluation des paramètres neurophysiologiques	174
I.3.2.2. Evaluation de l'intégrité axonale	175
I.4. Effet de la CNA sur le système nerveux central	177
I.4.1. Evaluation des capacités mnésiques par un test de mémoire spatiale	177
I.4.1.1. Choix des distances et optimisation du test	177
I.4.1.2. La CNA affecte la mémoire spatiale.....	180
I.4.1.3. Influence des hormones du cycle œstral sur les effets centraux de la CNA.....	181
I.4.2. Effet de la CNA sur l'intégrité de la BHE.....	183
I.4.2.1. Effet sur la perméabilité paracellulaire de la BHE	183
I.4.2.2. Effet délétère de la CNA sur les astrocytes	185
I.4.3. Effet sur les cellules prolifératives cérébrales	187
I.5. CNA et neuro-inflammation.....	191
I.5.1. Dosage cytokines pro-inflammatoires sériques circulantes.....	191
I.5.2. Signes d'inflammation au niveau du nerf sciatique.....	192
I.5.3. Signes d'inflammation au niveau de l'encéphale	195
II/ Effet de DU, AP et de la combinaison DUAP sur les atteintes périphériques	197
II.1. Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP sur l'hypersensibilité nociceptive induite par la CNA.....	197
II.1.1. Effet sur l'allodynie et l'hyperalgie mécanique CNA-induite	197
II.1.2. Effet sur l'allodynie thermique au froid CNA-induite	201
II.2. Effet de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre les altérations du nerf sciatique induites par la CNA	202
II.2.1. Effet sur les paramètres de conduction	202
II.2.2. Effet protecteur contre la diminution CNA-induite de la protéine NF200 par la DU, l'AP et de la combinaison DUAP.....	203
II.3. Effet de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP sur l'inflammation CNA-induite au niveau du nerf sciatique	204
III/ Effet de la DU sur les atteintes centrales	208
III.1. Toxicité de la DU à 8mg/kg	208
III.1.1. Toxicité additive de la DU à 8 mg/kg sur le poids des animaux	208
III.1.2. Effet de la DU sur la survie des animaux	210

III.2. Effet de la DU sur les troubles mnésiques CNA-induits	211
III.3. Effet contre la diminution de l'immunoréactivité de la protéine GFAP des astrocytes induite par la CNA.....	213
III.4. Effet de la DU contre la diminution CNA-induite du nombre de cellules prolifératives hippocampiques	216
III.5. Effet de la DU sur la diminution CNA-induite des précurseurs d'oligodendrocytes prolifératifs au niveau du corps calleux.....	219
III.6. Effet de la DU sur l'infiltration leucocytaire au niveau de l'encéphale	220
DISCUSSION	222
CONCLUSIONS Et PERSPECTIVES	242
BIBLIOGRAPHIE	247
ANNEXE - Article Soumis	276

LISTE des FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Systématisation des principales formes de neuropathies	24
Figure 2 : Evaluation de l'intensité de la douleur : Echelle visuelle analogique et échelle numérique	28
Figure 3 : Principaux effets neurotoxiques des agents de chimiothérapie	46
Figure 4 : Déclenchement du signal nociceptif et sensibilisation par la chimiothérapie	50
Figure 5 : Transmission du message nociceptif vers les neurones spinaux de 2 nd ordre et hyperexcitabilité chimio-induite	53
Figure 6 : Représentation schématique des voies de passage à travers la BHE	65
Figure 7 : Représentation schématique de l'anatomie de la BHE	67
Figure 8 : Mécanismes possibles dans l'atteinte centrale par la chimiothérapie	69
Figure 9 : Voies des contrôles descendants inhibiteurs sérotoninergiques et noradrénergiques.....	119

OBJECTIFS

Figure 10 : Conceptualisation du projet et des objectifs.....	130
---	-----

MATERIELS ET METHODES

Figure 11 : Mécanisme d'action de l'épirubicine et du docétaxel	134
Figure 12 : Protocole expérimental général avec stratégie thérapeutique préventive	136
Figure 13 : Test comportemental des filaments de von Frey	140
Figure 14 : Test comportemental de la goutte d'acétone	142
Figure 15 : Protocole expérimental du test de l' <i>object spatial recognition</i>	145
Figure 16 : Test comportemental du Catwalk.....	148
Figure 17 : Paramètre de support de la marche évalué par le test du Catwalk	150
Figure 18 : Evaluation cytologique des frottis vaginaux pour identifier le stade du cycle oestral des rates	153

Figure 19 : Schéma du principe du test du colorant bleu Evans (<i>Evans blue dye Assay</i>).....	155
Figure 20 : Protocole expérimental pour l'étude de la perméabilité para-cellulaire de la BHE	157
Figure 21 : Principales étapes pour l'étude de la perméabilité para-cellulaire de la BHE par le test du colorant bleu Evans.....	157
Figure 22 : Principe du dosage d'analytes par cytométrie en flux.....	164

RESULTATS

Figure 23 : Cinétique de la variation de poids des rats	168
Figure 24 : Effet de la CNA sur les paramètres de la locomotion des rats	171
Figure 25 : Effet de la CNA sur la sensibilité nociceptive	172
Figure 26 : Effet de la CNA sur les propriétés électrophysiologiques de la conduction du potentiel d'action du nerf sciatique	175
Figure 27 : Effet de la CNA sur le niveau d'expression de la protéine NF200	176
Figure 28 : Performance de la mémoire spatiale des rats naïfs selon une gamme de déplacement de l'objet.....	178
Figure 29 : Effet de la disposition centrale ou périphérique des objets sur le temps d'exploration des rats lors du test du <i>spatial object recognition</i>	179
Figure 30 : Effet de la CNA sur les performances mnésiques des rats.....	181
Figure 31 : Distribution des performances mnésiques dans le test du <i>spatial object recognition</i> des rates en fonction de leur stade de cycle œstral	182
Figure 32 : Effet de la CNA sur le passage para-cellulaire de la BHE.....	184
Figure 33 : Effet de la CNA sur l'immunoréactivité de la protéine GFAP au niveau du tissu cérébral.....	186
Figure 34 : Effet de la CNA sur le nombre de cellules prolifératives Ki67 positives, Ki67-NG2 positives et Ki67-non NG2 positives au niveau de l'hippocampe	189
Figure 35 : Effet de la CNA sur le nombre de cellules co-marquées NG2-Ki67 positives au sein du corps calleux.....	190
Figure 36 : Quantification par cytométrie de flux des concentrations de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des rats veh ou CNA	192
Figure 37 : Infiltration du nerf sciatique par les macrophages induite par la CNA.....	193

Figure 38 : Effet de la CNA sur l'immunoréactivité de la protéine GFAP au sein des nerfs sciatiques des rats	194
Figure 39 : Effet de la CNA sur l'infiltration de cellules CD45 positives au niveau de l'encéphale.....	195
Figure 40 : Effets protecteurs de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre les symptômes de la douleur neuropathique induits par la CNA.....	199
Figure 41 : Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre les altérations du potentiel d'action du nerf sciatique évoquées par la CNA.....	202
Figure 42 : Effets protecteurs de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre la diminution de NF200 induite par la CNA	203
Figure 43 : Effets protecteurs de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'augmentation du nombre de noyaux cellulaires dans le nerf sciatique.....	205
Figure 44 : Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'infiltration cellulaire du nerf sciatique : nombre de cellules CD11b/c positives	205
Figure 45 : Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'augmentation de l'immuno-réactivité de la protéine GFAP des cellules de schwann au niveau du nerf sciatique.....	206
Figure 46 : Effets de la DU sur la cinétique de la variation de poids des rats contrôles ou traités à la CNA	209
Figure 47 : Effet des différentes doses de DU combinées à la CNA sur le taux de survie des animaux.....	210
Figure 48 : Effet protecteur de la DU sur la perte CNA-induite des performances mnésiques des rats.....	212
Figure 49 : Effet protecteur de la DU sur la diminution de l'immunoréactivité de la GFAP induite par la CNA dans l'hippocampe	214
Figure 50 : Effet protecteur de la DU sur la diminution CNA-induite de l'immunoréactivité de la protéine GFAP dans le corps calleux.....	215
Figure 51 : Effet protecteur de la DU sur la diminution, du nombre de cellules prolifératives Ki67 positives, Ki67-NG2 positives et Ki67-non NG2 positives au niveau de l'hippocampe.....	218
Figure 52 : Effet protecteur de la DU sur la diminution du nombre de cellules co-marquées ki67-NG2 positives au niveau du corps calleux.....	219
Figure 53 : Effet de la DU sur l'infiltration de cellules CD45 positives au sein de l'encéphale.....	220

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Figure 54 : Conceptualisation des principaux résultats obtenus.....	243
---	-----

LISTE des TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de fibres nerveuses	21
Tableau 2 : Différents systèmes : type de fibres nerveuses impliquées et fonctions	22
Tableau 3 : Exemple de classification des neuropathies selon le type, la localisation et l'étiologie.....	25
Tableau 4 : Evaluation des troubles sensitifs	29
Tableau 5 : Evaluation de l'allodynie et de l'hyperalgie	30
Tableau 6 : Principaux agents de chimiothérapie : cibles et neuropathies périphériques associées	35
Tableau 7 : Processus cognitifs impliqués dans le <i>chemobrain</i> : définition et régions cérébrales impliquées	38
Tableau 8 : Principaux tests utilisés dans l'évaluation des principales fonctions cognitives altérées par la chimiothérapie	43
Tableau 9 : Recommandations dans le traitement des douleurs neuropathiques.....	90
Tableau 10 : Caractéristiques et résultats des essais contrôlés randomisés pour le traitement des NPCI	92-93
Tableau 11 : Différents modèles rongeurs de NPCI et effets neurotoxiques des différents agents utilisés contre le cancer.....	101-107
Tableau 12 : Différents modèles rongeurs de troubles cognitifs chimio-induits et effets neurotoxiques des différents agents utilisés contre le cancer	108-111

MATERIELS ET METHODES

Tableau 13 : Cohortes utilisées pour réaliser les différentes études	137
Tableau 14 : Liste des anticorps utilisés en immunomarquage fluorescent.....	160

RESULTATS

Tableau 15 : Répartition de la sévérité des symptômes douloureux neuropathiques selon le groupe expérimental.....	200
---	-----

LISTE des principales ABREVIATIONS

5-FU	5-Fluorouracil
5-HT	5-Hydroxytryptamine ou Sérotonine
AJ	<i>Adherens Junction</i> (Jonctions adhérentes)
AP	Alloprégnanolone
ASIC	<i>Acid-Sensing Ionic Channel</i> Canal ionique activé par l'acidification du milieu
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BHN	Barrière Hémato-Nerveuse
BrdU	Bromodésoxyuridine
CA	Corne d'Ammon
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i> Peptide lié au gène de la calcitonine)
CNA	Chimiothérapie Néo-Adjuvante
DO	Docétaxel
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i> Ganglions de la racine dorsale
DU	Duloxétine
EPI	Epirubicine
EVA	Echelle Visuelle Analogique
FACT-Cog	<i>Functional Assessment of Cancer Therapy-Cognitive function</i> Evaluation cognitive fonctionnelle des thérapies du cancer
FNIE	Fibre Nerveuse Intra-Epidermique
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> Protéine acide fibrillaire
HCN	<i>Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotides-gated</i> Canaux activés par hyperpolarisation
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i> Association internationale pour l'étude de la douleur
IFN	Interféron
IL	Interleukine
ip	Intrapéritonéale

IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
IRMf	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
iv	Intraveineuse
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> Facteur inhibiteur de la leucémie
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i> Protéine basique de la myéline
ME	Moelle Epinière
MN	Mononeuropathie
MNM	Mononeuropathie Multiple
MRP	<i>Multi-drug Resistance Protein</i> Protéine associée à résistance multi-médicamenteuse
NA	Noradrénaline
NCI-CTCAE	<i>National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events</i> Critères communs pour les évènements indésirables
NET	<i>Norepinephrine Transporter</i> Transporteur de la noradrénaline
NF200	Neurofilament 200 kDa
NG2	<i>Neural/glial antigen 2</i> Antigène neuronale/gliale 2
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NOR	<i>New Object Recognition</i> Reconnaissance d'un nouvel objet
NPCI	Neuropathie Périphérique Chimio-Induite
OXAL	Oxaliplatine
PAC	Paclitaxel
PAN	Potentiel d'Action Nerveux
PE	Phycoérythrine
P-gp	Glycoprotéine P
PIDC	Polyradiculoneuropathie Inflammatoire Démyélinisante Chronique
PN	Polyneuropathie

PO	Précurseurs d'Oligodendrocytes
PRN	Polyradiculoneuropathie
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> Espèce réactive de l'azote
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> Espèce réactive de l'oxygène
SB	Substance Blanche
SD	Sprague-Dawley
SERT	<i>Serotonin Transporter</i> Transporteur de la sérotonine
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOR	<i>Spatial Object Recognition</i> Reconnaissance spatiale
SSNRi	<i>Selective Serotonin Reuptake inhibitors</i> Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
TCA	<i>Tricyclic Antidepressant</i> Antidépresseur tricyclique
TDM	Trouble Dépressif Majeur
TJ	<i>Tight Junction</i> Jonctions serrées
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> Facteur de nécrose tumoral- α
TRPA1	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin1</i> Récepteur du potentiel transitoire – Ankyrine 1
TRPM8	<i>Transient Receptor Potential Melastatin8</i> Récepteur du potentiel transitoire – Mélastatine 8
TRPV	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i> Récepteur du potentiel transitoire aux vanilloïdes
VC	Vitesse de Conduction
veh	véhicule
VINC	Vincristine

RESUME de la THESE

La chimiothérapie néo-adjuvante du cancer du sein (CNA) est fréquemment utilisée avant le traitement loco-régional (chirurgie et/ou radiothérapie). En induisant une nette régression de la tumeur primaire, la CNA rend les cancers avancés opérables, et permet en plus une chirurgie conservatrice à tous les stades du cancer (Lombardi et al. 2010). En dehors de son action bénéfique sur la réduction du volume tumorale, la CNA a malheureusement des effets secondaires délétères dont les plus handicapants sont des atteintes neurologiques fréquentes (Fabi et al. 2004, Walker et al. 2011, Eckhoff et al. 2015). Ces atteintes du système nerveux périphérique (SNP ; douleur neuropathique chimio-induite ou troubles sensorimoteurs) et/ou central (SNC ; déficits attentionnels, cognitifs et/ou mnésiques) peuvent persister plusieurs années après l'arrêt du traitement antitumoral (Seigers et al. 2013, Eckhoff et al. 2015). L'apparition de ces atteintes, non seulement diminue considérablement la qualité de vie des patientes, mais peut contraindre au changement voire à l'arrêt du traitement antitumoral optimal. Les atteintes du SNP ou neuropathies périphériques (NP) induites par la CNA varient selon l'agent anticancéreux et peuvent concerner jusqu'à 80% des patients. Plus spécifiquement pour le docétaxel utilisé dans la CNA, la fréquence des NP est de 65% sous la forme aiguë et de 35% sous la forme chronique (Reyes-Gibby et al. 2009, Boyette-Davis et al. 2015, Makker et al. 2017). En plus des atteintes du SNP, 20 à 75% des patientes traitées par chimiothérapie rapportent des plaintes cognitives (difficultés à se souvenir, à penser ou à se concentrer) regroupées sous le terme de « *chemobrain* ». Ces déficits du SNC, impliquent la mémoire épisodique, la mémoire de travail, l'attention et les fonctions exécutives (F. 2011, Monje and Dietrich 2012). Les plaintes cognitives, rapportées subjectivement par les patientes et objectivées par des tests neuropsychologiques, sont accompagnées de changements structuraux et fonctionnels visualisés par des approches de neuro-imagerie. Ces modifications suggèrent particulièrement une pathologie de la substance blanche (SB) qui semble être

vulnérable aux effets de la chimiothérapie (Schagen and Wefel 2013). Par ailleurs, le spectre des déficits neurocognitifs et les analyses fonctionnelles par neuro-imagerie suggèrent que la CNA provoque une toxicité de l'hippocampe qui joue un rôle clef dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Dietrich et al. 2015, Orchard et al. 2017).

La prise en charge médicale des troubles neurologiques chimio-induits pose de sérieux problèmes compte tenu de l'inefficacité des médicaments neuroprotecteurs actuellement disponibles (Massey et al. 2014, Brewer et al. 2016). Divers mécanismes sont évoqués pour expliquer les effets neuropathiques périphériques des anticancéreux ou antinéoplasiques. Par exemple, les anticancéreux sont capables de provoquer une baisse de la synthèse de certaines protéines du cytosquelette dans les axones des afférences primaires et d'induire une cytotoxicité des cellules de Schwann. Des preuves émergentes indiquent également que les agents cytotoxiques entraînent une neuro-inflammation périphérique impliquée dans la pathogenèse de la NP (Wang et al. 2012, Velasco and Bruna 2015). Ainsi, bien que les mécanismes engendrant les NP ne soient pas encore complètement connus, il apparaît néanmoins concevable d'envisager des effets délétères directs des anticancéreux sur le SNP du fait de l'absence d'une barrière protectrice comme la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui protège le SNC. En revanche, les altérations neurologiques centrales associées à la chimiothérapie sont plus difficiles à expliquer par une action directe parce que les composés utilisés dans la CNA sont supposés être incapables de franchir la BHE (Fellner et al. 2002, Pardridge 2007, Venishetty et al. 2013).

Un des thèmes forts de recherche de l'Unité UMR_S INSERM U1119/Unistra est l'évaluation du potentiel de nouvelles substances thérapeutiques (amélioration des effets de molécules déjà connues et/ou caractérisation de nouveaux neuroprotecteurs) dans le but de développer des stratégies efficaces contre les NP chimio-induites (Meyer et al. 2010, Meyer et al. 2011, Meyer et al. 2013, Patte-Mensah et al. 2014, Taleb et al. 2017). Cette thèse s'intègre

dans le cadre de cette recherche multidisciplinaire et translationnelle activement menée dans l'UMR_S INSERM 1119 par des chercheurs et des médecins neurologues. Par ailleurs, il convient de souligner le fait que divers modèles expérimentaux de NP douloureuses chimio-induites ont été décrits dans la littérature (Roglio et al. 2009, Cervellini et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011, Meyer, Patte-Mensah et al. 2013, Hoke and Ray 2014, Patte-Mensah, Meyer et al. 2014, Di Cesare Mannelli et al. 2017, Taleb, Bouzobra et al. 2017) mais, à notre connaissance, il n'existe à ce jour aucun modèle animal disponible reproduisant les symptômes évoqués par la CNA « Taxotère séquentiel » qui est actuellement le standard international fréquemment utilisé dans le traitement du cancer du sein (Kaufmann et al. 2003, Smith et al. 2013). La CNA « Taxotère séquentiel » consiste en un traitement séquentiel avec une anthracycline - l'épirubicine (EPI) – qui est suivi de l'administration d'un taxane - le docétaxel (DO) (Kaufmann, von Minckwitz et al. 2003, Smith, Pang et al. 2013).

L'analyse des éléments contextuels et bibliographiques rappelés ci-dessus nous a permis de définir deux principaux objectifs dans le cadre de cette thèse :

(i) générer et caractériser avec une approche multidisciplinaire un modèle animal reproduisant de façon pertinente les symptômes périphériques et centraux induits par la CNA «Taxotère séquentiel» combinant les traitements EPI et DO (CNA-[EPI-DO])

(ii) utiliser le modèle animal généré pour évaluer le potentiel et/ou l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les symptômes évoqués par la CNA-[EPI-DO].

Pour générer le modèle animal, le traitement séquentiel CNA-[EPI-DO] utilisé en clinique humaine a été adapté en dose par kg/poids corporel et administré selon le même protocole à des rats femelles adultes. Les symptômes neurologiques périphériques et centraux et les mécanismes qui sous-tendent l'induction des effets de la CNA-[EPI-DO] ont été étudiés grâce

à une approche multidisciplinaire associant des analyses comportementales, électrophysiologiques, biochimiques/moléculaires et histo-pathologiques.

Nous avons réalisé l'étude des symptômes périphériques, en particulier l'analyse des paramètres de la douleur neuropathique chimio-induite, en utilisant les tests des filaments de von Frey et de la goutte d'acétone qui permettent d'évaluer respectivement les seuils de sensibilité mécanique (von Frey) et thermique au froid (acétone). Nos résultats montrent que la CNA-[EPI-DO] provoque une allodynie-hyperalgie mécanique et une allodynie thermique au froid qui débutent 14 jours après l'initiation de la CNA, atteignent un plateau à 21 jours et se maintiennent jusqu'à 28 jours après le début du traitement chimiothérapique. Nos études électrophysiologiques ont révélé une altération du potentiel d'action nerveux du nerf sciatique chez les rates traitées par la CNA-[EPI-DO]. En effet, la vitesse de conduction et l'amplitude du potentiel d'action nerveux des animaux recevant la [CNA-EPI-DO] sont respectivement réduites de 20 et 50% comme cela est aussi observé chez les patientes traitées par la CNA qui développent ensuite une axonopathie (Chaudhry et al. 1994, Dougherty et al. 2004). Nos données électrophysiologiques ont été confirmées par des analyses immunohistologiques et Western Blot qui montrent une diminution de 60% de l'expression du neurofilament 200 kD, marqueur spécifique du cytosquelette neuronal dans les nerfs sciatiques et les ganglions rachidiens. Par ailleurs, un marquage histochimique par le DAPI (marqueur des noyaux cellulaires) montre une augmentation de 40 % de la densité des noyaux dans les nerfs sciatiques des animaux traités par la CNA-[EPI-DO], suggérant une infiltration de ces nerfs par les cellules immunitaires. Nous avons confirmé cette hypothèse en utilisant un anticorps dirigé contre le CD11b/c, un marqueur des macrophages. Nos résultats montrent une densité de cellules CD11b/c-positives 5 fois plus élevée dans les nerfs sciatiques des rates traitées à CNA-[EPI-DO] par rapport aux contrôles. Des dosages par cytométrie en flux ne révèlent pas d'augmentation de la concentration sérique de cytokines pro-inflammatoires circulantes

(interféron et facteur de nécrose tumoral alpha ou TNF- α) chez les rates traitées par la CNA-[EPI-DO]. Ces résultats suggèrent que l'infiltration du nerf sciatique par les macrophages ne serait pas induite par une cytokine pro-inflammatoire circulante. Cette infiltration nerveuse pourrait alors résulter de l'activité des cellules de Schwann (CS) qui peuvent enclencher, après un traumatisme nerveux, un processus de dédifférenciation et sécréter des médiateurs (TNF- α , Interleukine-6 et -1) capables de recruter des macrophages, d'augmenter l'excitabilité neuronale et de contribuer à l'hypersensibilité douloureuse (Jessen and Mirsky 2016, Lees et al. 2017). Au cours de cette reprogrammation cellulaire adaptative, les CS surexpriment des marqueurs spécifiques tels que la protéine acide fibrillaire gliale ou *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Nous avons donc évalué l'expression du GFAP dans les nerfs sciatiques et constaté une surexpression de 60% de ce marqueur chez les rates traitées par la CNA-[EPI-DO] comparées aux témoins, ce qui confirme le rôle facilitateur des CS dans le processus d'infiltration des nerfs sciatiques par les macrophages.

Pour ce qui concerne l'évaluation des effets centraux de la CNA-[EPI-DO], compte tenu des symptômes cognitifs observés chez les patientes traitées par la CNA [EPI-DO] qui suggèrent une altération des fonctions de l'hippocampe, nous avons choisi d'étudier dans notre modèle animal une performance mnésique dépendante de l'intégrité de l'hippocampe (Tuscher et al. 2016). Nous avons alors utilisé le test de reconnaissance spatiale pour comparer la mémoire spatiale des rates témoins et traitées par la CNA-[EPI-DO] car ce test permet de détecter chez les rongeurs un déclin cognitif précoce et/ou subtile (van Hagen et al. 2015, Ces et al. 2018). Nos résultats montrent que la CNA-[EPI-DO] provoque chez l'animal des troubles de l'apprentissage et des capacités mnésiques similaires aux déficits cognitifs décrits chez les patientes ou dans d'autres modèles de *chemobrain* (de Ruiter et al. 2011, Jim et al. 2012, Seigers, Schagen et al. 2013).

Pour aborder l'étude des mécanismes impliqués dans la toxicité centrale évoquée par la CNA-[EPI-DO], une première question a été de savoir si ce traitement altère la perméabilité de la BHE. Compte tenu de l'action toxique classiquement exercée par les taxanes sur le cytosquelette, nous avons d'abord étudié la possibilité d'une traversée paracellulaire de la BHE. L'utilisation d'un traceur de haut poids moléculaire, le bleu evans, a révélé une augmentation significative de 25% du passage para-cellulaire de la BHE après 28 jours de traitement CNA. De façon intéressante, cette perméabilité accrue de la BHE est accompagnée d'une diminution de 25% de l'expression de GFAP, marqueur des cellules astrocytaires qui sont des éléments constitutifs de la BHE (Ballabh et al. 2004). Ainsi, la fragilisation de la BHE évoquée par la CNA-[EPI-DO] pourrait faciliter le passage des molécules anticancéreuses dans le SNC où elles induiraient une action toxique directe sur les populations cellulaires en division. Ceci pourrait alors rendre compte, au moins en partie, des altérations centrales associées à la CNA. L'hippocampe est une structure clé dans le fonctionnement de la mémoire spatiale, notamment en raison de la neurogenèse locale qui permet un renouvellement cellulaire via la prolifération des précurseurs neuronaux (Lemaire et al. 2012). Nous avons donc mesuré la prolifération cellulaire dans l'hippocampe et constaté que la CNA-[EPI-DO] induit une diminution de 50% du nombre de cellules exprimant le marqueur Ki-67 des cellules prolifératives. Ces résultats suggèrent que la CNA provoque une toxicité des cellules souches impliquées dans la neurogenèse hippocampique adulte qui pourrait sous-tendre les troubles cognitifs observés. Par ailleurs, compte tenu des anomalies de la substance blanche suspectées par les études de neuro-imagerie menées chez les patientes souffrant de troubles centraux chimio-induits, nous nous sommes également intéressés aux précurseurs des oligodendrocytes (PO) qui produisent la myéline dans le SNC (Hou et al. 2018). Des études de double-marquage immunohistochimique du *Neural/glial antigen 2* ou NG2 (marqueur des PO) et de Ki-67 (marqueur de prolifération cellulaire) montrent que la

CNA-[EPI-DO] provoque une diminution de 35% ou 80% du nombre de cellules double-marquées NG2-Ki67 positives respectivement dans le corps calleux (CC) ou l'hippocampe. Ces données sont en faveur d'un effet toxique de la CNA-[EPI-DO] sur les PO et la myélinisation dans le SNC.

L'ensemble de nos résultats, qui permet de mettre en évidence plusieurs similitudes entre les symptômes périphériques et centraux observés chez les patientes et les rates traitées par la CNA-[EPI-DO], montre que notre modèle animal est pertinent pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les altérations neurophysiologiques induites par la CNA. En effet, la clinique est en attente de thérapies efficaces car les médicaments actuellement disponibles sont peu ou pas efficaces contre les NP induites par la CNA. A l'heure actuelle, pour traiter les NP, les soignants prescrivent des antidépresseurs tricycliques (amitriptyline), des anti-convulsants (pregabaline, gabapentine), des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (duloxétine ou DU), voire des opioïdes forts (tramadol). Malheureusement, ces médications présentent une efficacité modeste voire absente, en plus d'être mal tolérés et d'être sujets à de nombreuses contre-indications (Al-Atiyyat and Obaid 2017, Truini 2017). La prise en charge des troubles cognitifs est également problématique ; les traitements médicamenteux (méthylphénidate, modafinil, donepezil) et les thérapies cognitivo-comportementales montrent, sans réelle preuve d'efficacité, un bénéfice mitigé (Kohli et al. 2009, McNeil 2012).

La DU est une molécule qui, en dehors de son domaine d'application initial comme antidépresseur, a reçu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des neuropathies diabétiques. Son utilisation s'est étendue aux NP chimio-induites où son efficacité s'est avérée être partielle voire absente pour certains patients. En clinique, l'augmentation des doses de DU n'améliore pas son efficacité contre les NP, alors que les effets secondaires liés à sa toxicité sont exacerbés (Smith, Pang et al. 2013, Lunn et al. 2014).

Nous avons alors cherché à améliorer l'efficacité de la DU en l'utilisant à faible dose (pour limiter les effets secondaires) mais en le combinant avec l'allopregnanolone (AP), un neurostéroïde naturel, qui s'est révélé très efficace à faible dose pour contrecarrer les symptômes neurologiques évoqués par les NP dans divers modèles expérimentaux (Patte-Mensah et al. 2006, Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011, Meyer, Patte-Mensah et al. 2013, Patte-Mensah, Meyer et al. 2014, Taleb, Bouzobra et al. 2017). De façon similaire à ce que l'on observe en clinique, la DU (2mg/kg/2jours) utilisée seule exerce un effet partiel et très modeste contre les symptômes périphériques induits par la CNA-[EPI-DO] dans notre modèle. L'AP (4mg/kg/2jours) seule s'est montrée plus efficace que la DU, mais son effet bénéfique protecteur reste également partiel. De façon intéressante, la combinaison DUAP permet de prévenir complètement l'apparition de tous les symptômes périphériques ainsi que les altérations biochimiques/moléculaires et histopathologiques induits par la CNA-[EPI-DO].

Différents travaux montrent que la DU exerce des effets positifs sur la cognition, notamment chez des patients atteints de trouble dépressif majeur (Herrera-Guzman et al. 2010, Greer et al. 2014). Cependant, la DU n'a pas été évaluée en préclinique ou en clinique dans le contexte du *chemobrain*. Nous avons alors testé le potentiel neuroprotecteur de la DU contre les altérations centrales induites par la CNA-[EPI-DO]. Nos études doses-réponses montrent des effets délétères de la DU à forte dose (8mg/kg) qui deviennent morbides par toxicité additive à celle de la CNA. Les tests cognitifs ont montré que, pour une tâche de reconnaissance spatiale difficile, la DU à 1mg/kg ne permet pas de prévenir le déclin des performances mnésiques induites par la CNA-[EPI-DO], alors que la DU à 2mg/kg le permet de façon partielle. Par contre, la DU à 4mg/kg prévient complètement la diminution des performances mnésiques induite par la CNA-[EPI-DO]. De façon intéressante, au cours d'une tâche jugée plus facile, seule la DU à 1mg/kg n'est pas suffisante pour prévenir les déficits

cognitifs induits par la CNA-[EPI-DO], alors qu'à 2 et 4mg/kg les performances mnésiques restent identiques à celles observées chez les rates contrôles. Bien que la DU permette de prévenir la toxicité CNA-[EPI-DO]-induite des astrocytes, et ceci quelle que soit la dose utilisée, l'inefficacité de la DU à 1mg/kg dans l'amélioration des performances cognitives pourrait en partie s'expliquer par son incapacité à contrecarrer la toxicité des cellules prolifératives Ki-67 positives dans l'hippocampe: on observe une diminution de 50% du nombre de ces cellules malgré le traitement DU (1mg/kg), alors qu'une dose de 2 ou 4 mg/kg permet une prévention complète. Nos travaux révèlent également que la DU à 2 et 4 mg/kg contrecarre efficacement la diminution du nombre de PO prolifératifs dans le CC et l'hippocampe. Curieusement, alors qu'à 1mg/kg la DU prévient efficacement cette toxicité dans le CC, cette dose n'est pas suffisante pour une prévention totale dans l'hippocampe où on observe une diminution de 60% du nombre de PO.

En conclusion, notre travail a permis de caractériser un modèle animal pertinent de troubles neurologiques périphériques et centraux évoqués par la CNA-[EPI-DO] fréquemment utilisée dans le traitement du cancer du sein. Ce modèle a été utilisé pour révéler l'efficacité d'un traitement concomitant DUAP contre les symptômes périphériques. Nos travaux montrent également que la DU exerce une action efficace contre les déficits cognitifs évoqués par la CNA-[EPI-DO] chez l'animal mais les doses efficaces, bien que modérées, restent encore susceptibles de provoquer une toxicité à long terme.

L'ensemble de ces données expérimentales ouvrent des perspectives prometteuses à explorer pour le développement de stratégies efficaces contre les altérations neurophysiologiques périphériques et centrales évoquées par la CNA. En particulier, nous envisageons dans nos perspectives de poursuivre sur les aspects suivants : **(i)** l'élucidation plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'induction des effets de la CNA ; **(ii)** l'évaluation des effets du BR297 (seul ou combiné avec la DU) qui est un nouvel analogue de

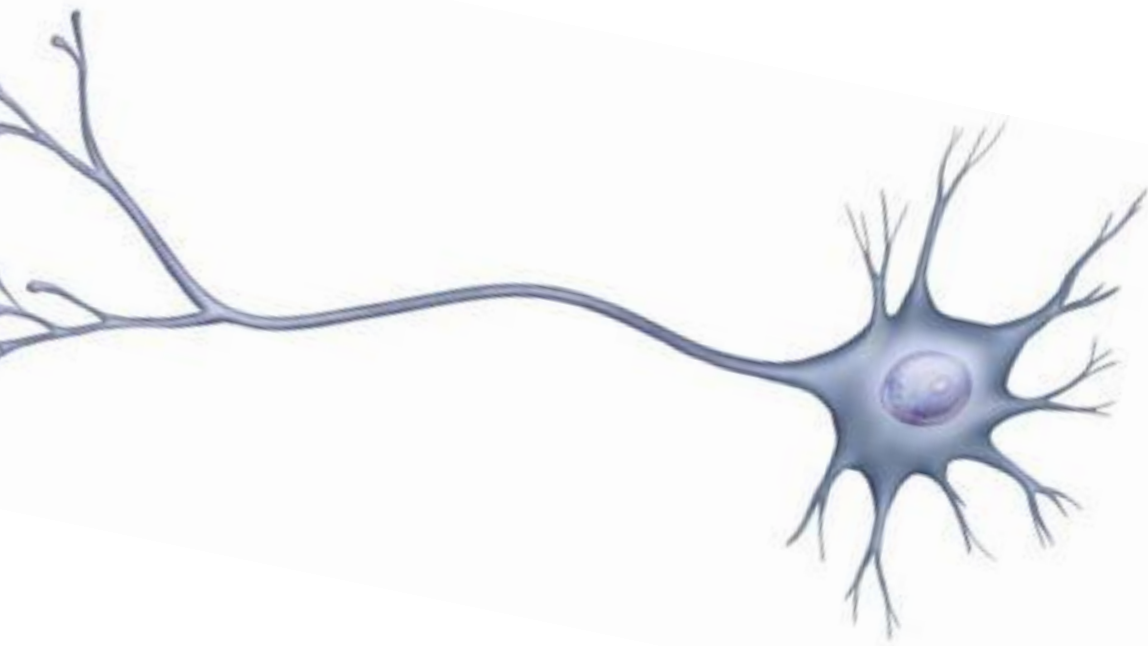
l'AP breveté par notre Laboratoire. Le BR297 est un neuroprotecteur efficace qui n'exerce pas d'action prolifératrice quel que soit le type cellulaire, contrairement à l'AP qui, certes ne stimule pas la prolifération des cellules adénocarcinomes Walker 256 provenant de cancer mammaire de rat, mais reste susceptible d'activer la prolifération d'autres types cellulaires (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Karout et al. 2016, Taleb et al. 2018). Ces travaux permettront de sécuriser encore davantage les pistes thérapeutiques explorées dans notre modèle animal pour ensuite envisager sereinement la translation de nos données positives/prometteuses en clinique humaine grâce à l'accompagnement des neurologues du centre d'investigation clinique de Strasbourg qui sont également membres de notre Unité de Recherche.

ABSTRACT

Neoadjuvant chemotherapy (NAC) represents a major progress in breast cancer therapy. By shrinking significantly, the tumor volume, NAC allows conservative surgery at all stages of breast cancer. Unfortunately, NAC also induces neurological dysfunctions that jeopardize the chances of success of anti-tumor treatments. Therapeutic management of these neurological disorders remains a major concern because neuroprotective drugs currently available are not effective. Furthermore, investigations to characterize novel effective therapeutics are hampered by the lack of reliable experimental models mimicking the neurological symptoms evoked by the sequential epirubicin (EPI)/docetaxel (DO)-NAC or [EPI-DO]-NAC frequently used in humans.

The present thesis work allowed the first characterization of a relevant animal model of [EPI-DO]-NAC-induced peripheral and central neurological disorders. This preclinical model has successfully been used to demonstrate the efficacy of duloxetine and allopregnanolone concomitant treatment against [EPI-DO]-NAC-evoked painful peripheral neuropathy. Our results also reveal a beneficial action of duloxetine against [EPI-DO]-NAC-induced cognitive deficits. The thesis opens promising perspectives to be explored for the development of effective therapies against [EPI-DO]-NAC-induced neurological alterations.

INTRODUCTION



I/ Les Neuropathies

I.1. Sémiologie générale des neuropathies

Le terme « neuropathie » est généralement utilisé en médecine pour désigner une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux périphérique (SNP). Cependant, les atteintes peuvent également concerner des voies appartenant au système nerveux central (SNC), provoquant notamment ce que l'on appelle des douleurs centrales. Ces douleurs spontanées ou provoquées sont causées soit par une atteinte des voies lémniscales véhiculant les messages de la moelle épinière (ME) vers le tronc cérébral puis l'encéphale, soit par une affection des voies supra-spinales exerçant un contrôle descendant sur la ME. Ainsi, le terme neuropathie regroupe un ensemble d'atteintes neurologiques très polymorphes dont les symptômes dépendent en grande partie de la cause sous-jacente, de l'individu, des composantes nerveuses affectées et du type de fibres nerveuses endommagées. Les neuropathies, qui affectent 4% de la population générale et plus de 8% des sujets âgés de plus de 65 ans (Hughes 2002), constituent également l'une des 5 raisons majeures de la consultation neurologique (Watson and Dyck 2015). Par ailleurs, les symptômes invalidants provoqués par les neuropathies et la difficulté de prise en charge entraînent des conséquences socio-économiques graves, et une souffrance importante pour les patients et leur entourage.

Les caractéristiques et les fonctions des fibres nerveuses généralement affectées dans les neuropathies périphériques sont récapitulées ci-dessous dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de fibres nerveuses

Fibre musculaire	I	II	III	IV
Fibre sensorielle	A α	A β	A δ	C
Gaine de myéline	+++	++	+	-
Diamètre (μ m)	13-20	6-12	1-6	<1
Vitesse de conduction (m/s)	80-120	35-75	5-40	0,5-2

Tableau 2 : Différents systèmes : type de fibres nerveuses impliquées et fonctions

Moteur	Sensoriel			Autonome	
A α	A α / A β	A δ	C	A δ	C
Contrôle musculaire	-Proprioception -Toucher -Vibration	-Perception thermique -Douleur rapide et bien localisée (mécanique, thermique)	-Perception thermique -Douleur tardive et diffuse (mécanique, thermique, chimique)	-Rythme cardiaque -Pression sanguine -Fonction digestive -Fonction uro-génitale	

[Adapté de Vinik et al., 2006 (Vinik et al. 2006)]

Il existe donc autant de symptômes que de causes aux neuropathies, dont la sémiologie inclut des symptômes sensitifs, moteurs et/ou neurovégétatifs.

✓ Symptômes sensitifs

Parmi les symptômes sensitifs les plus fréquents, les patients rapportent des paresthésies (sensations de fourmillements, d'engourdissements et/ou de picotements désagréables mais non douloureux), des dysesthésies (sensations de brûlure et/ou d'irritation, sensation de choc électrique/coup de poignard), et de l'hypoesthésie (diminution de la sensibilité du tact). On note aussi l'apparition de douleurs constantes ou intermittentes, mal calmées par les antalgiques usuels, avec une hypersensibilité nociceptive caractérisée par de l'allodynie (douleur déclenchée par un stimulus normalement non douloureux) et de l'hyperalgie (douleur excessive suite à un stimulus normalement douloureux) mécanique et/ou thermique. Les cliniciens notent également des cas de troubles de l'équilibre, caractéristiques d'atteinte de fibres proprioceptives.

✓ Symptômes moteurs

La faiblesse musculaire, en particulier des membres inférieurs, est le trouble moteur le plus communément observé, entraînant chez le patient une difficulté à se mouvoir et/ou à rester debout. Par ailleurs, selon l'étiologie de la pathologie, les patients peuvent présenter le syndrome des pieds creux et des orteils en griffe, des crampes musculaires au repos, des fasciculations, et plus rarement une amyotrophie distale des membres, voire des paralysies.

✓ Symptômes neurovégétatifs

De manière plus atypique, la neuropathie peut se révéler par une manifestation dysautonomique ou l'apparition de troubles trophiques lorsque la composante autonome est endommagée. Ainsi, certains patients présentent des malaises orthostatiques ou post-prandiaux en lien avec une hypotension artérielle, des troubles de la sudation, des troubles mictionnels ou autres symptômes gastro-intestinaux, ou des troubles de l'érection (Dineen and Freeman 2015).

I.2. Classification des neuropathies et étiologies

Il existe un très grand nombre de neuropathies, dont le type est défini selon plusieurs critères tels que la localisation de l'atteinte, l'implication d'un ou plusieurs nerfs, mais également selon les causes qui sont très diverses.

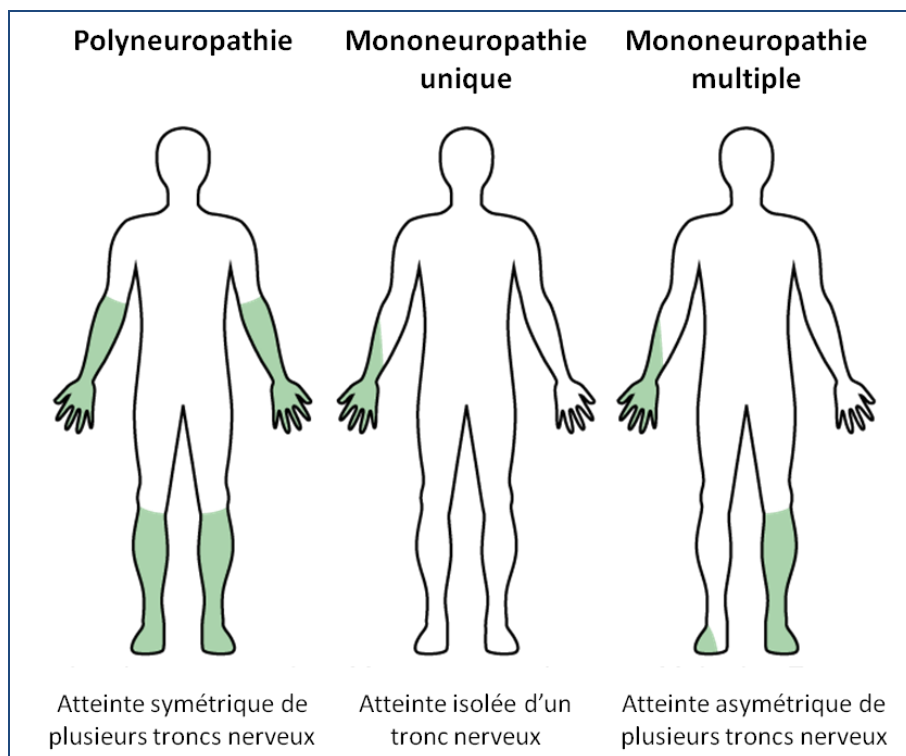
✓ Systématisation des neuropathies

Les neuropathies sont catégorisées par la localisation des lésions nerveuses (Callaghan et al. 2015), en distinguant les atteintes des troncs nerveux (neuropathies tronculaires) et des racines nerveuses (neuropathies radiculaires), et en incluant la topographie des troubles

nerveux. On distingue donc les polyneuropathies, les mononeuropathies uniques ou multiples (figure 1), ou encore les polyradiculoneuropathies.

- La **mononeuropathie** concerne une atteinte isolée d'un tronc nerveux.
- La **mononeuropathie multiple** (multinévrite) est une atteinte asymétrique de plusieurs nerfs.
- La **polyneuropathie** (polynévrite) fait référence à une atteinte symétrique de plusieurs troncs nerveux, souvent longueur-dépendante (atteinte en « gants » et en « chaussettes »).
- **Les neuropathies** sensitives ou motrices correspondent à une atteinte spécifique des neurones (corps cellulaire) sensitifs ou moteurs purs.
- Enfin, les **polyradiculoneuropathies** (polyradiculonévrites) font référence à une atteinte symétrique de plusieurs racines nerveuses.

Figure 1 : Systématisation des principales formes de neuropathies



En plus de la systématisation topographique, la classification des neuropathies s'opère selon plusieurs critères, dont un exemple de classification est présenté dans le tableau 3 :

- Selon le caractère de la neuropathie : aiguë (<4 semaines), subaiguë (4 à 8 semaines) ou chronique (>8 semaines) ;
- Selon la ou les composante(s) impliquée(s) : neuropathie motrice, sensitive et/ou dysautonomique ;
- Selon la spécificité de l'atteinte : Neuropathie axonale, démyélinisante ou neuronopathie (atteinte spécifique neuronale) ;
- Selon la cause étiologique : acquise ou héréditaire.

Tableau 3 : Exemple de classification des neuropathies selon le type, la localisation et l'étiologie

Type lésionnel	Distribution topographique	Syndrome (exemple)	Cause possible
Démyélinisante	PRN aiguë	Guillain-Barré	Inflammatoire ou infectieuse
	PRN chronique	PIDC	Inflammatoire
	PN	Charcot-Marie-Tooth	Héréditaire
Axonale	PN		Idiopathique Diabète Alcool Chimiothérapie
	MN		Diabète
	MNM		Diabète Infectieuse
Neuronale (corps cellulaire)	Neuronopathie sensitive	Gougerot-Sjögren	Inflammatoire Dysimmune
	Neuronopathie motrice	SLA	Maladie neurodégénérative

PRN : Polyradiculoneuropathie ; PN : Polyneuropathie ; MN : Mononeuropathie ; MNM : mononeuropathie multiple ; PIDC : Polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique ; SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

✓ Etiologies

Les neuropathies sont de formes très diverses, mais sont également causées par de multiples facteurs :

- Métaboliques : diabète, intolérance au glucose, insuffisance rénale, carence en vitamines...
- Toxiques ou chimiques : alcool, chimiothérapie, médicaments, métaux lourds...
- Endocrinopathies : hypothyroïdie
- Maladies systémiques inflammatoires : lupus érythémateux disséminé, syndrome de Gougerot-Sjögren, sarcoïdose...
- Cancer, lymphome
- Dysglobulinémies
- Infectieuses : bactérienne ou virale / diphtérie, zona, lèpre, VIH, Lyme, Hépatite C...
- Héréditaires : Charcot-Marie-Tooth (CMT), Neuropathie sensitive et autonome héréditaire (NSAH), Neuropathie amyloïde familiale (ou Amylose à transthyrétine ATTR) ...

I.3. Diagnostic et évaluation clinique

Le bon diagnostic et l'évaluation d'une neuropathie permettent d'orienter les choix pour offrir une prise en charge optimale aux patients. Chez tout patient porteur d'une affection, ou suivant un traitement connu comme susceptible d'entraîner une neuropathie, même si ce dernier ne se plaint d'aucun signe évocateur, le diagnostic préventif doit être systématique. En combinaison à l'utilisation de questionnaires, l'évaluation quantitative des signes neuropathiques est généralement réalisée avec un examen clinique, parfois combiné à

des scores composites et/ou des tests neurophysiologiques, ainsi que d'autres méthodes quantitatives (Postma and Heimans 2000, Saad et al. 2014).

I.3.1. Anamnèse – Interrogatoire

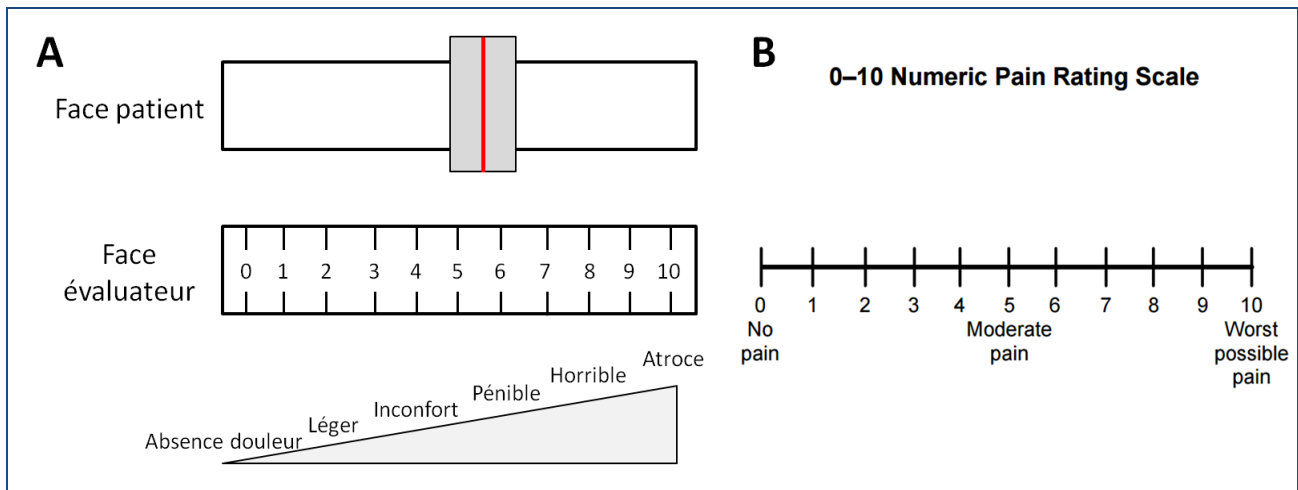
Pour orienter le diagnostic, en premier lieu un interrogatoire portant sur l'individu et sur ses antécédents familiaux est effectué, constitué de 4 étapes consistant à répondre à 4 questions : Quoi ? Où ? Quand ? Quel contexte ?

- **Quoi ?** Se réfère aux modalités atteintes (sensitives, motrices, autonomes) ;
- **Où ?** Concerne la distribution des atteintes qui doit s'attacher à retrouver les signes évocateurs d'une atteinte dans un territoire neuro-anatomique compatible avec une atteinte du système nerveux ;
- **Quand ?** Correspond au moment de la survenue s'il peut être défini ;
- **Quel contexte ?** Les informations recherchées comprennent les antécédents familiaux et de l'individu, ainsi que les traitements actuels afin de savoir si la lésion peut être connue (traumatisme...) ou si le patient est porteur d'une pathologie connue affectant le système nerveux (diabète, alcoolisme, infections...). Cette étape est essentielle au diagnostic étiologique.

Plusieurs outils d'aide au diagnostic ont été développés et validés, notamment pour rechercher une douleur neuropathique, ou pour évaluer et catégoriser l'intensité des symptômes des patients. Par exemple, l'échelle de douleur neuropathique **DN4** est un questionnaire composé de 10 items à cocher sous forme de 4 questions, qui permet d'estimer la probabilité d'une douleur neuropathique chez le patient. D'autres outils tels que des échelles, par exemple l'échelle visuelle analogique (**EVA**) et l'échelle numérique d'évaluation

de la douleur (**ENED**), schématisées sur la figure 2, permettent de quantifier la douleur et l'inconfort du patient sur une échelle de 0 à 10 (Saad, Tafani et al. 2014).

Figure 2 : Evaluation de l'intensité de la douleur : Echelle visuelle analogique (A) et échelle numérique (B)



Cette enquête étiologique, permettant de trouver certains facteurs déterminants nécessaires à la bonne orientation du diagnostic, est complétée par des examens cliniques neurologiques.

I.3.2. Examen clinique

En adéquation avec la sémilogie rencontrée en cas de neuropathie, et selon l'issue de l'interrogatoire du patient, l'examen clinique neurologique est composé d'une étude quantifiée des différents types de sensibilité et des capacités motrices et/ou autonomiques.

✓ Evaluation de la sensibilité

En premier lieu l'examen clinique vise à évaluer les différents types de sensibilité afin de déterminer les signes déficitaires, et d'identifier l'installation de signes cliniques positifs. Le

tableau 4 ci-dessous présente quelques-uns des tests cliniques effectués ainsi que les signes et symptômes qui sont évalués dans le cadre de l'examen clinique.

- Evaluation de la sensibilité à la température (au chaud et au froid), par l'utilisation d'objet chaud (40°C) ou froid (20°C) ;
- Evaluation de la sensibilité au toucher et à la pression par pression du doigt ;
- Evaluation de la sensibilité à la vibration par l'utilisation d'un diapason ;
- Recherche d'une instabilité par déficit proprioceptif (signe de Romberg), par un test de la position debout, pieds joints, yeux ouverts puis fermés ;
- Evaluation de la sensibilité à la douleur, où les signes recherchés sont une allodynie et/ou une hyperalgie. Les tests utilisés sont récapitulés dans le tableau 5. De cette façon les différentes formes d'allodynie (mécanique dynamique, mécanique statique, thermique au chaud et au froid) et l'hyperalgie thermique sont recherchées par des tests de frottement avec un pinceau, des tests de pression, ou par l'utilisation des filaments de von Frey et des tests utilisant des objets chaud ou froid respectivement.

Pour exemple, le test sensoriel quantitatif (**TSQ**) est une batterie de tests qui reprend ces éléments et mesure la perception des stimuli mécaniques, thermiques et douloureux. Le TSQ est donc une aide à l'évaluation de l'allodynie et de l'hyperalgie (Truini 2017).

Tableau 4 : Evaluation des troubles sensitifs

Signes déficitaires/sensations	Examen clinique	Instrument pour la quantification
Toucher	Pression du doigt	Filament de von Frey
Vibration	Diapason	Vibramètre
Pique	Aiguille	Filament de von Frey
Froid	Objet froid (20°C)	Thermotest
Chaud	Objet chaud (40°C)	Thermotest

Tableau 5 : Evaluation de l'allodynie et de l'hyperalgie

Douleur évoquée	Examen clinique
Allodynie mécanique	Filaments de von Frey Pression du doigt Frottement avec brosse ou pinceau
Allodynie thermique (chaud et froid)	Objet chaud/froid
Hyperalgie thermique (chaud et froid)	Tube à essai eau chaude 45°C/glacé

✓ **Evaluation de la motricité**

La recherche d'un déficit moteur est associée à la recherche de troubles de la force musculaire et des réflexes.

- Evaluation de la force musculaire, dont la gradation est effectuée au moyen de l'échelle numérique développé par le *Medical Research Council* (MRC) avec une cotation de 0 à 5 ;
- Evaluation des réflexes ostéo-tendineux.

Pour effectuer l'examen clinique, le clinicien peut également utiliser des scores composites de mesures de la fonction nerveuse périphérique qui ont été développés et validés dans le but d'être fiables et plus sensibles que les échelles classiques (Argyriou et al. 2012). Le **Score Neuropathique Total (SNT)** est composé de 7 items qui incluent l'aspect des signes et symptômes, ainsi que l'habileté des fibres nerveuses, avec un score compris entre 0 et 28, et permet l'évaluation des aspects objectifs et subjectifs de la neuropathie (Smith et al. 2008). Cet outil évalue de façon objective les fonctions sensorielles et motrices (notamment dans les membres inférieurs et supérieurs), les changements dans les réflexes tendineux et/ou la force d'agrippement, combinés avec des reports subjectifs des patients et des symptômes autonomiques (Fehrenbacher 2015, Curcio 2016).

I.3.3. Examens complémentaires : tests neurophysiologiques et autres méthodes quantitatives

Pour compléter et préciser les données obtenues suite à l'examen clinique et aux questionnaires, d'autres méthodes objectives et quantitatives sont utilisées pour confirmer le diagnostic.

- La **biopsie cutanée** est un geste peu invasif qui permet, après un marquage simple, de quantifier la densité des fibres nerveuses intra-épidermiques (FNIE). En effet, la réduction de la densité des FNIE est associée à l'existence d'une neuropathie (Periquet et al. 1999, Lacomis 2002, Fehrenbacher 2015). Les praticiens cherchent à mesurer de façon objective la densité de FNIE, le plus souvent par immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre la protéine PGP 9.5, qui est un marqueur non spécifique neuronal (Thompson et al. 1983, Kroigard et al. 2014).

- Les **tests neurophysiologiques** permettent d'étudier et d'évaluer les propriétés d'excitabilité, de conduction et de transmission du signal électrique.

Parmi ces tests, l'électromyogramme (EMG) est un enregistrement qui permet d'étudier l'activité électrique du muscle lorsqu'il est au repos, et lorsqu'il se contracte sous la commande volontaire du patient. L'EMG est utile pour préciser certaines étiologies ainsi que les sites lésionnels (neuropathie diffuse, atteintes radiculaires...) et permet l'évaluation des grosses fibres A α et A β .

Les potentiels évoqués somesthésiques permettent également d'étudier et de vérifier l'intégrité fonctionnelle des grosses fibres à partir de la stimulation des troncs nerveux. Ils sont utiles en pratique soit pour discriminer une lésion proximale (entre le ganglion rachidien et la moelle) soit pour identifier une lésion distale (plexus).

Le test de la conduction nerveuse (*Nerve Conduction Study* ou NCS) est une exploration fonctionnelle où plusieurs paramètres sont étudiés. La vitesse de conduction des fibres sensorielles et/ou motrices renseigne sur l'état de la myéline ; l'amplitude maximale du potentiel d'action nerveux (PAN), qui est directement liée au nombre de fibres recrutées suite à la stimulation électrique, rend compte de l'intégrité des fibres sollicitées.

Les tests de seuil de perception du courant (*Current Perception Threshold* ou CPT) évaluent la perception sensorielle. Cette technique permet de mesurer l'intégrité fonctionnelle du nerf sensoriel en déterminant la quantité de courant nécessaire pour stimuler une sensation qui peut être perçue par le patient (Griffith et al. 2014). En utilisant la méthode standard de CPT, les fibres A β , les fibres A δ et les fibres C sont évaluées sélectivement à des fréquences de 2000, 250 et 5 Hz respectivement (Kurozawa et al. 2010).

Pour évaluer les fonctions autonomiques, le test de reflexe axonale sudomoteur quantitatif (*Quantitative Sudomotor Axon Reflex Testing* ou QSART) est appliqué. Cet enregistrement utile pour évaluer les troubles du système nerveux autonome (Thaisetthawatkul et al. 2013) mesure l'activité des nerfs impliqués dans le contrôle de la transpiration (Riedel et al. 1999).

II/ Neuropathie et atteintes centrales chimio-induites

La chimiothérapie reste un traitement de première ligne pour de nombreuses formes de cancer, mais est malheureusement associée à des troubles neurologiques fréquents et invalidants. Les neuropathies causées par les agents cytotoxiques utilisés dans les traitements anticancéreux sont communément appelées neuropathies périphériques chimio-induites (NPCI). En plus d'avoir un impact significatif sur la qualité de vie des patients, la NPCI est le deuxième facteur limitant au succès de la chimiothérapie après la toxicité hématologique : cette neurotoxicité induite par la chimiothérapie est l'une des principales raisons qui obligent le corps soignant à modifier ou à arrêter de manière précoce le traitement anticancéreux optimal. Bien que le terme neuropathie évoque les atteintes du SNP, la chimiothérapie se révèle être également toxique pour le SNC, malgré la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, diverses plaintes cognitives sont fréquemment rapportées par les patients traités avec la chimiothérapie. Ces altérations cognitives sont regroupées dans la littérature sous le terme de *chemobrain* ou encore *chemofog*, faisant référence à un état de brouillard cognitif. Ces modifications cognitives suite à la chimiothérapie, qui sont insidieuses au quotidien avec un impact négatif sur la qualité de vie des patients, s'ajoutent aux autres effets secondaires des traitements, notamment les NPCI. La compréhension des conséquences neurophysiologiques de la chimiothérapie est donc un enjeu majeur.

Le présent chapitre traite de manière non exhaustive de la sémiologie et de la physiopathologie des troubles neurologiques induits par la chimiothérapie, notamment des NPCI et du syndrome du *chemobrain*. En accord avec la logique du projet de thèse, le cas particulier des troubles du système nerveux induit par la chimiothérapie néo-adjuvante (CNA) du cancer du sein, ainsi que leurs enjeux spécifiques, seront évoqués dans un prochain chapitre complémentaire.

II.1. Incidence et sémiologie des troubles neurologiques chimio-induits

II.1.1 Chimiothérapie et système nerveux périphérique : les neuropathies chimio-induites

II.1.1.1. Incidence

La NPCI constitue une complication invalidante fréquente. De façon générale, la NPCI a une forte prévalence dès le début du traitement anti tumoral : selon le/les agent(s) administré(s) et les doses, entre 30 et 90% des patients développent une NPCI sous sa forme aiguë. Cette complication peut également se développer en une forme chronique et perdurer plusieurs années après l'arrêt de la chimiothérapie, que l'on estime pour 35 à 40% des patients (Reyes-Gibby, Morrow et al. 2009, Seretny et al. 2014, Boyette-Davis, Walters et al. 2015, Makker, Duffy et al. 2017). Les praticiens rapportent également pour environ 10% des patients ayant suivi une chimiothérapie, l'apparition d'une neuropathie dans les semaines qui suivent l'arrêt du traitement anti tumoral, appelée effet « *coasting* » dans la littérature anglo-saxonne (Eckhoff, Feddersen et al. 2015). Chaque agent de chimiothérapie ayant son propre mécanisme pour lutter contre les cellules cancéreuses, les études montrent des taux variables de NPCI, avec une incidence et une sévérité qui dépendent également du schéma d'administration et de la dose cumulative. Bien que la NPCI soit un effet secondaire délétère commun à plusieurs agents cytotoxiques, les agents les plus souvent en cause sont les sels de platine, les alcaloïdes et les taxanes. Les incidences des NPCI pour ces classes de chimiothérapeutique sont récapitulées dans le tableau 6.

Par exemple, l'oxaliplatine (sels de platine) est probablement le médicament anticancéreux le plus neurotoxique, avec 90% des patients qui développent une neuropathie aiguë à la suite de l'administration de la chimiothérapie, et 30% à 50% qui développent une forme chronique, souvent liée à la répétition des cycles de chimiothérapie (Tofthagen 2010, Beijers et al. 2014, Kerckhove et al. 2017). Bien que les symptômes diminuent avec le temps, des études cliniques sur le long terme semblent démontrer la persistance de la neuropathie

entre 24 mois et 8 ans après l'arrêt de la chimiothérapie (Park et al. 2011, Yothers et al. 2011, Beijers, Mols et al. 2014).

Concernant l'apparition des NPCI suite aux alcaloïdes, on observe l'installation de symptômes neuropathiques chez 35 à 45 % des patients (Postma et al. 1993, Verstappen et al. 2005). Ces symptômes apparaissent souvent après plusieurs semaines de traitement, mais peuvent survenir après la première dose de chimiothérapie. Il a également été montré que pour 30% des patients les symptômes perdurent voire s'aggravent après l'arrêt du traitement (Haim et al. 1994).

L'incidence d'apparition d'une NPCI suite aux taxanes varie de 18 à 50% des patients. Alors que le paclitaxel entraîne l'apparition d'une NPCI aiguë chez près de 70% des patients (Kerckhove, Collin et al. 2017), 35 à 40% des patients traités par le docétaxel souffrent de douleurs neuropathiques aiguës, et 35% développent une forme chronique à la fin de la chimiothérapie (Reyes-Gibby, Morrow et al. 2009, Eckhoff, Feddersen et al. 2015, Eckhoff, Knoop et al. 2015) où les symptômes peuvent s'aggraver (De Iuliis et al. 2015). Ici encore on observe chez 45% des patients une persistance de la neuropathie au moins 1 an après la fin de la chimiothérapie (Ventzel et al. 2016).

Tableau 6. Principaux agents de chimiothérapie : cibles et neuropathie périphérique associée

Classe	Alkylants (sels de Platine)	Taxanes	Alcaloïdes
Cible	ADN	Fuseau mitotique	
Mécanisme	Inhibition de la réplication et cassure des brins d'ADN par liaison covalente avec nt et pontage entre deux brins	Inhibition de la dépolymérisation des MT	Inhibition de la polymérisation des MT
Exemple	Oxaliplatine	Docétaxel	Vincristine
Fréquence NP associée	90 % aiguë 30-50 % Chronique	40-65 % aiguë 35 % chronique	35-45 % aiguë 30 % chronique

MT : microtubule ; NP : Neuropathie périphérique ; nt : nucléotides

II.1.1.2. Sémiologie

Globalement, les NPCI sont des polyneuropathies longueur-dépendantes (distale), à prédominances sensitives ou sensitivo-motrices (Seretny, Currie et al. 2014), pour lesquelles on retrouve dans l'ensemble une sémiologie identique aux autres neuropathies. Les symptômes sensoriels les plus fréquents, qui se développent généralement en premier lieu au niveau des mains et des pieds, sont des paresthésies et des dysesthésies (Postma, Benard et al. 1993). L'apparition de douleurs constantes ou intermittentes avec une hypersensibilité nociceptive caractérisée par de l'allodynie et de l'hyperalgie mécanique et/ou thermique est également fréquemment rapportée. Les symptômes sensoriels précités sont dans certains cas associés à une diminution de l'habilité à détecter le toucher et les sensations de piqûres, avec une perte de la sensibilité vibratoire et une proprioception altérée (Boyette-Davis, Walters et al. 2015, Fehrenbacher 2015, Kerckhove, Collin et al. 2017), évoquant une atteinte des grosses fibres myélinisées. Les examens neurophysiologiques des patients avec une NPCI révèlent globalement une diminution de la vitesse de conduction (VC) nerveuse sensorielle et de l'amplitude du PAN, reflétant ainsi une démyélinisation et/ou une axonopathie (Chaudhry, Rowinsky et al. 1994, Dougherty, Cata et al. 2004). Les dysfonctionnements sensoriels couramment rapportés peuvent être accompagnés de troubles moteurs, caractérisés par une faiblesse musculaire ou des crampes. Dans certains cas, la neuropathie se révèle par des troubles de la marche et/ou de l'équilibre, de la dextérité (écrire, boutonner, prendre de petits objets...) ainsi qu'une difficulté à tenir des objets ou bien à avaler. Enfin, dans de rares cas, le système neurovégétatif est atteint causant des symptômes autonomes tels qu'une variabilité de la fréquence cardiaque, une hypotension orthostatique, des troubles de la vessie et de l'intestin, voire une paralysie oculaire et des cordes vocales (Hancock and Naysmith 1975, Quasthoff and Hartung 2002).

II.1.2 Chimiothérapie et système nerveux central : syndrome du *chemobrain*

II.1.2.1. Incidence

Des références aux changements cognitifs associés à la chimiothérapie peuvent être trouvées à partir des années 80 (Oxman and Silberfarb 1980, Silberfarb et al. 1980, Silberfarb 1983). Cependant, une attention scientifique sérieuse n'a été accordée à ce sujet qu'à partir de la fin des années 90, où les contributions dans la littérature deviennent courantes (Schagen et al. 1999, Brezden et al. 2000, Olin 2001, Myers 2009, Ahles 2012). Ceci peut être expliqué par la prise en compte des plaintes cognitives des patients, longtemps controversées et associées à un effet nocebo suite à l'annonce du diagnostic, et aux facteurs confondants tels que l'humeur, la fatigue ou encore l'état anxiodépressif. La majorité des études longitudinales incluant des évaluations pré- et post-chimiothérapie ont trouvé des changements cognitifs évidents suite à la chimiothérapie (Ahles 2012), dont l'incidence varie entre 20 et 75% des patients ayant suivi un traitement chimiothérapique (Schagen, van Dam et al. 1999, Tchen et al. 2003, Vardy et al. 2008, Bompaire et al. 2017). Là encore, les estimations varient selon les agents cytotoxiques utilisés, la dose et le schéma d'administration, mais également selon les investigations probablement en raison des différences méthodologiques d'évaluations utilisées (nature de l'étude, tests utilisés...). Ces déficits retentissant sur la qualité de vie des patients et impactant leur habileté fonctionnelle, bien que dans certains cas transitoires, peuvent également perdurer plusieurs années après l'arrêt de la chimiothérapie pour près de la moitié des patients (Mehnert et al. 2007). En effet, certaines études révèlent des déficits cognitifs 5 (Ahles and Saykin 2002), 10 (de Ruiter, Reneman et al. 2011) et 15 ans (Yamada et al. 2010) après l'arrêt du traitement antitumoral.

II.1.2.2. Sémiologie et processus neurobiologiques altérés par la chimiothérapie

Les fonctions cognitives sont des processus cérébraux qui nous permettent de recevoir des informations sur notre environnement, de les sélectionner, les traiter, les transformer, les stocker, les manipuler, et de s'en servir pour interpréter et être en contact avec le monde qui nous entoure. Elles correspondent à la capacité de penser, à prendre des décisions, à se concentrer et à se souvenir des faits, et permettent ainsi de mettre en action et d'adapter notre comportement. L'intégrité des fonctions cognitives est donc essentielle aux activités quotidiennes, aussi bien dans le cadre professionnel que personnel. Suite à la chimiothérapie, les fonctions cognitives, souvent diminuées de façon subtile et légère avec un retentissement insidieux au quotidien, impliquent de manière commune la mémoire - en particulier la mémoire épisodique et de travail -, les fonctions exécutives, l'attention et la vitesse de traitement (Jansen et al. 2005, Reid-Arndt et al. 2010, Yamada, Denburg et al. 2010), entraînant des difficultés à se souvenir, à planifier, à penser ou à se concentrer. Les différentes définitions des processus cognitifs altérés dans le syndrome du *chemobrain*, ainsi que les régions cérébrales impliquées, sont récapitulés dans le tableau 7.

Tableau 7. Processus cognitifs impliqués dans le *chemobrain* : définition et régions cérébrales impliquées

Processus cognitif	Type	Définition	Régions cérébrales impliquées
Mémoire	Mémoire de travail	Manipulation mentale d'une information	Cortex frontal
	Mémoire épisodique	Souvenirs d'événements personnels inscrits dans un contexte spatio-temporel	Cortex frontal Hippocampe
Fonctions exécutives	Souplesse mentale	Planification, organisation, élaboration de stratégie, adaptation, raisonnement, ...	Cortex préfrontal Aires motrices, sensorielles, associatives, cortex limbique
	Planification/mise en œuvre		
	Contrôle/régulation des actions		
Attention	Sélective	Permet de préparer nos actions ou de les entreprendre, de trier et sélectionner les informations, de les traiter de manière approfondie	Cortex frontal Structures limbiques Thalamus Ganglions de la base
	Divisée		
	Soutenue		
Vitesse de traitement		Habileté cognitive correspondant au temps que prend un individu pour réaliser une tâche mentale	

✓ La mémoire

La mémoire se réfère à la capacité d'acquérir, de stocker et de récupérer/restituer différents types d'informations pour guider la sortie comportementale d'un individu. Elle est indispensable à l'identité, au savoir, aux connaissances, à la réflexion et même à la projection de chacun dans le futur. On parle de **mémoire de travail** lorsque l'information, alors maintenue en mémoire à court terme, fait l'objet d'une manipulation mentale. Elle permet le maintien temporaire et la manipulation de l'information lors de la réalisation de tâches cognitives complexes. Elle permet, par exemple, à un serveur de retenir qui a commandé quoi. La manipulation d'informations en mémoire de travail nécessite l'activation du cortex frontal et préfrontal (Wager and Smith 2003). La **mémoire épisodique** est définie comme la capacité de rappeler des expériences spécifiques, « comme si l'on devait voyager mentalement pour ré-expérimenter des événements individuels » (Allen and Fortin 2013), et permet à l'individu de prendre conscience de sa propre identité (Tulving 2001). Elle fait référence aux souvenirs des événements qu'un individu a personnellement vécus, inscrit dans un contexte spatio-temporel précis et dont la restitution nécessite un effort conscient. Les informations stockées dans ce système de mémoire comprennent 3 composantes : le « où », « quoi » et « quand » d'un événement. Cette mémoire dépend de façon critique de l'hippocampe (contexte spatial et temporel), mais implique également l'amygdale (composante émotionnelle) et le cortex frontal (Fuster 2001, Allen and Fortin 2013). Les informations stockées en mémoire épisodique sont facilement verbalisables et accessibles à la conscience. L'étude de la **mémoire spatiale** chez le rongeur permet de modéliser la mémoire épisodique ; on parle alors de mémoire de « type épisodique » (*episodic-like*). En regroupant les composantes « quoi » et « où », la mémoire spatiale permet d'encoder, de stocker et de restituer des informations sur l'environnement qui nous entoure. Il est connu que l'hippocampe joue un rôle crucial dans ce

processus mnésique, aussi bien chez l'Homme (Kahana et al. 1999, Ekstrom et al. 2005, Epstein et al. 2017) que chez l'animal (O'Keefe 1999, Warburton and Brown 2015).

✓ **Les fonctions exécutives**

Les fonctions exécutives sont des fonctions cognitives responsables de la régulation et du contrôle de nos comportements. Elles interviennent dans des situations nouvelles (non routinières), complexes et/ou conflictuelles pour lesquelles il n'existe pas de solution toute faite, et où il y a nécessité d'adapter notre comportement. Elles sont nécessaires pour effectuer des activités telles que la planification, l'organisation, l'élaboration de stratégies, la résolution de problèmes ou encore le raisonnement. Pour effectuer ces opérations mentales, il faut d'abord analyser la situation, puis élaborer un plan de résolution, et enfin l'organiser de manière séquentielle, tout en vérifiant son bon déroulement par rapport à l'objectif de départ (Miyake et al. 2000). Les zones cérébrales impliquées sont essentiellement localisées dans le cortex préfrontal, mais elles sont en interaction avec la plupart des aires cérébrales (aires motrices, aires sensorielles, cortex limbique, aires associatives) (Niendam et al. 2012, Nee and D'Esposito 2017).

✓ **L'attention**

L'attention est une capacité cognitive que nous utilisons au quotidien. Elle fait référence à l'ensemble des processus qui nous permettent de nous préparer à une action ou de l'entreprendre, de trier et sélectionner des informations, et de les traiter de manière approfondie. L'attention peut également être définie comme la capacité à sélectionner et à se concentrer sur les stimuli jugés les plus importants, et existe sous plusieurs formes : **(i)** l'attention sélective (ou focalisée), **(ii)** l'attention divisée (ou partagée), et **(iii)** l'attention dite soutenue. Elle fait intervenir les régions corticales frontales, mais également les structures limbiques, le thalamus et les ganglions de la base (Asplund et al. 2010, Corbetta and Shulman 2011).

✓ La vitesse de traitement

La vitesse de traitement définit la rapidité psychomotrice/cognitive à laquelle nous traitons une information. C'est l'habileté cognitive qui correspond au temps que prend un individu pour réaliser une tâche mentale, entre le moment où il reçoit la stimulation et qu'il y réponde. Cela fait référence à la capacité à traiter une information de manière automatique, et par conséquent rapidement, sans y penser consciemment. Ceci peut interférer également sur les habiletés exécutives, c'est pourquoi une personne avec une vitesse de traitement lente aura plus de mal ou prendra plus de temps pour planifier, se fixer des objectifs, prendre des décisions, commencer des tâches, ou encore maintenir son attention (Chiaravalloti and DeLuca 2008, Grzegorski and Losy 2017).

II.1.2.3. Evaluation clinique des atteintes cognitives chimio-induites

Nous venons de voir que les déficits cognitifs observés chez les patients présentent un profil frontal, avec des domaines touchés tel que l'apprentissage, la mémoire, la vitesse de traitement et les fonctions exécutives. Les mesures objectives obtenues par l'utilisation de tests neuropsychologiques, qui restent les standards pour évaluer les fonctions cognitives des patients, sont par conséquent en adéquation avec ces domaines. Parmi les tests recommandés par le groupe de travail international sur le cancer et la cognition (*International cancer and cognition task force* ou ICCTF) (Wefel et al. 2011), résumés dans le tableau 8, on retrouve le test d'apprentissage verbal d'Hopkins révisé (*verbal learning test-revised* ou HVLT-R) qui permet d'évaluer la mémoire épisodique, le test des tracés (*Trail Making Test* ou TMT) qui permet de mesurer la vitesse psychomotrice et certains aspects des fonctions exécutives, et le test d'association verbale contrôlée (*controlled oral word association* ou COWA) qui mesure la fluence verbale qui requiert également certains aspects des fonctions exécutives. Les mesures d'évaluation de la mémoire de travail ne sont pas incluses dans la suggestion de la

batterie d'évaluation, mais les investigateurs sont encouragés à en pratiquer selon leur propre préférence, leur expérience et les plaintes subjectives du patient. Un autre groupe de réflexion sur les évaluations cognitives, le Grec-Onco, a également proposé en 2015 une batterie adaptée à la prise en charge des patients présentant une plainte cognitive ou des troubles cognitifs suite à la chimiothérapie (Bompaire, Durand et al. 2017), également résumés dans le tableau 8. Ce groupe préconise l'utilisation du test du rappel libre – rappel indicé à 16 items (RL-RI 16) et les figures de Rey pour évaluer la mémoire épisodique, des tests d'empan (qui définit la capacité de stockage de la mémoire à court terme, et correspond au plus grand nombre d'items que le sujet est capable de rappeler immédiatement) pour la mémoire de travail, et d'autres tests tels que la tâche de Stroop (mesure de la capacité d'inhibition), le TMT et des tests de fluences verbales pour mesurer les fonctions exécutives et l'attention. D'autres tests sont également utilisés dans les principales études : pour évaluer la mémoire épisodique les cliniciens utilisent, par exemple, le test des 15 mots de Rey, le test de Grober et Buschke, le test de rétention visuelle de Benton et les échelles de Wechsler, ces derniers permettant également de mesurer la mémoire de travail. Pour évaluer certains aspects des fonctions exécutives ainsi que l'attention, on retrouve le test des performances continues (*continuous performance test*-CPT), le test d'attention sélectif de Ruff et l'échelle de Weschler révisé (*Weschler Adult Intelligence Scale Revised* ou WAIS-R) qui inclut également l'étude de la vitesse de traitement, pouvant également être étudiée par des tâches de réaction complexe et d'annulation de lettre.

Tableau 8. Principaux tests utilisés dans l'évaluation des principales fonctions cognitives altérées par la chimiothérapie [Adapté de (Bompaire, Durand et al. 2017)]

Fonctions cognitives	Recommandations Grec-onco (2015)	Recommandations ICCTF (Wefel, 2011)	Autres principaux utilisés
Mémoire épisodique	RL-RI 16 Figures de Rey	HVLT-R	Echelles Wechsler 15 mots de Rey Test Grober et Buschke Test de rétention visuelle de Benton
Mémoire de travail	Empan chiffre Empan visuel		Echelle mémoire de Wechsler
Fonctions exécutives et attention	Stroop TMT A/B Fluences verbales	TMT COWA	WAIS-R CPT Test d'attention sélective de Ruff
Vitesse de traitement			WAIS-R Tâche de réaction complexe Tâche d'annulation de lettre

RL-RI : 16 Rappel libre, rappel indicé à 16 items ; HVLT-R : *verbal learning test-revised* ; TMT : *Trail Making Test* ; COWA : *controlled oral word association* ; WAIS-R : *Wechsler Adult Intelligence Scale Revised* ; CPT : *continuous performance test* ; ICCTF : *International cancer and cognition task force*

Bien que les plaintes auto-rapportées subjectives (plaintes cognitives) ne sont pas validées comme un moyen d'évaluer la cognition, elles permettent d'évaluer par l'utilisation d'auto-questionnaires le ressenti des patients, et ainsi d'orienter le choix d'utilisation de certains tests cognitifs. Pour appréhender au mieux la plainte cognitive, ces questionnaires portent sur les répercussions des troubles cognitifs sur différents domaines de la cognition (mémoire, attention/concentration...). Ainsi, le groupe Grec-onco a également recommandé en 2015 une batterie d'auto-questionnaires dans le cadre de l'évaluation des troubles cognitifs faisant suite à la chimiothérapie (Bompaire, Durand et al. 2017). On retrouve l'échelle d'évaluation fonctionnelle de la fonction cognitive suite à la thérapie du cancer (*The Functional Assessment of Cancer Therapy-Cognitive Function* ou **FACT-Cog**) qui est le seul questionnaire d'auto-évaluation évaluant spécifiquement la cognition (Joly et al. 2012). Il s'agit de la première mesure d'évaluation du déclin cognitif validée chez les patients atteints

de cancer et qui peut potentiellement être utilisée dans la pratique clinique standard pour évaluer les troubles cognitifs des patients avant, pendant et après la chimiothérapie.

Enfin, bien qu'à l'heure actuelle il n'existe pas de biomarqueurs, les progrès en neuroimagerie permettent d'évaluer objectivement les changements cérébraux faisant suite à la chimiothérapie, où l'imagerie cérébrale s'avère être utile pour la recherche de modifications et de différences morphologiques et/ou fonctionnelles (Orchard, Gaudier-Diaz et al. 2017).

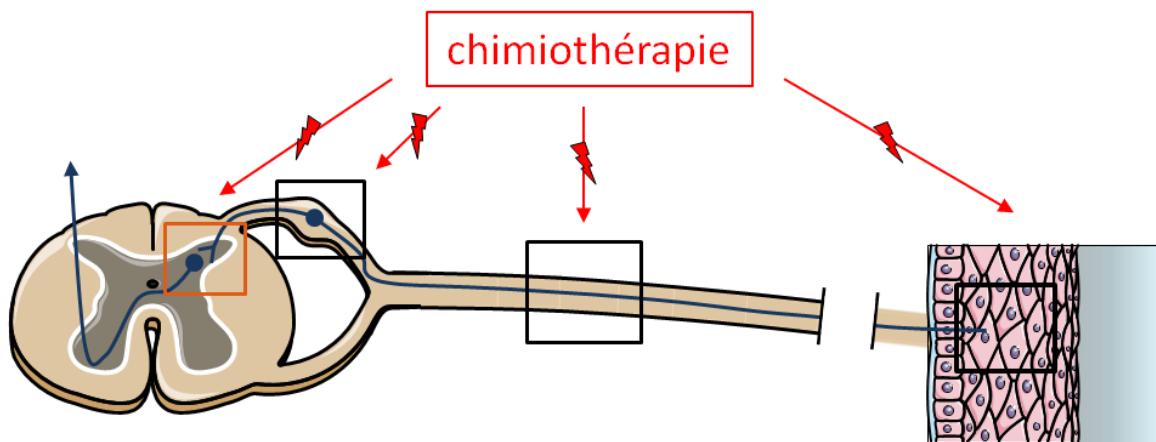
II.2. Physiopathologie des troubles du système nerveux chimio-induits

Divers processus physiopathologiques sous-tendent les troubles neurologiques observés chez les patients à la suite d'un traitement anticancéreux. Bien que les mécanismes engendrant les neuropathies périphériques ne soient pas encore complètement connus, il apparaît néanmoins concevable d'envisager des effets délétères directs des anticancéreux sur le SNP du fait de l'absence d'une barrière protectrice comme la BHE du SNC. En effet, les micro-vaisseaux de plusieurs structures du SNP, comprenant les ganglions de la racine dorsale et des racines vertébrales à proximité, sont dépourvus de propriétés de barrière. Par conséquent, ces sites sont considérés comme particulièrement vulnérables à la chimiothérapie. En revanche, les altérations neurologiques centrales associées à la chimiothérapie sont plus difficiles à expliquer par une action directe, parce que la grande majorité des composés chimiothérapeutiques utilisés sont supposés ne pas franchir la BHE. Bien que l'étiologie exacte des déficits cognitifs ne soit pas encore connue, plusieurs hypothèses sont suggérées. Les données issues de l'imagerie et des études précliniques sur des modèles animaux soutiennent l'hypothèse selon laquelle la chimiothérapie affecte la structure et la fonction cérébrale, et commencent à fournir des preuves pour les mécanismes candidats du déclin cognitif induit par la chimiothérapie.

II.2.1. Physiopathologie des atteintes périphériques

La barrière hémato-nerveuse (BHN) protège et contrôle l'homéostasie endoneurale du SNP. La présence de cette barrière permet de restreindre le mouvement des médiateurs solubles et des leucocytes depuis le contenu sanguin jusqu'au parenchyme du SNP (Kanda 2013). Cependant, comparé à son homologue au niveau du SNC (la BHE), la BHN est plus permissive. Ainsi, il semble évident que les traitements utilisés en chimiothérapie conduisent à de nombreux changements structuraux et fonctionnels au niveau du SNP résumés sur la figure 3, qui peuvent expliquer en grande partie les signes et symptômes, notamment sensoriels, observés chez les patients et contribuant ainsi à la NPCI. Bien que les neurones ne se divisent pas, ils semblent très sensibles aux agents de chimiothérapie. Beaucoup de recherches sur les mécanismes ciblent les altérations et modifications des propriétés neuronales, mais les études mettent également en lumière des altérations au niveau de la glie, et l'installation d'une neuroinflammation.

Figure 3. Principaux effets neurotoxiques des agents de chimiothérapie



MOELLE ÉPINIÈRE	NEURONES DU DRG	AXONE	TERMINAISONS NERVEUSES INTRA-EPIDERMiques
Dysfonctionnement mitochondrial Processus inflammatoires Dérégulation canaux ioniques : hyperexcitabilité			Perte des fibres intra-epidermiques
Dérégulation neurotransmission			Processus inflammatoire
Transport axonal altéré			Dérégulation canaux ioniques : hyperexcitabilité
Migration cellules gliales (astrocytes, microglie et cellules satellites)	Mort cellulaire		Décharges spontanées

Dégradation / Dysfonctionnement / Hyperexcitabilité nerveuse

II.2.1.1 Troubles sensoriels par hyperexcitabilité nerveuse : modifications de l'activité et/ou de l'expression de récepteurs canaux en périphérie

Le système nociceptif peut être activé par une grande variété de stimuli caractérisés par une forte intensité, de nature mécanique, thermique et/ou chimique potentiellement nocifs pour les tissus et donc pour l'individu. Parmi les récepteurs localisés sur les nocicepteurs, on retrouve des récepteurs canaux perméables aux cations tels que les récepteurs du potentiel transitoire (TRP) activés par des stimuli mécaniques, thermiques et par certaines substances

chimiques. On retrouve également des récepteurs canaux qui s'activent par l'acidification extracellulaire, qui se produit notamment après une lésion tissulaire et un stress métabolique : les récepteurs ASIC (ASIC pour *acid sensing ionic channel*). On retrouve d'autre part des récepteurs canaux P2X à l'ATP comme messenger libéré par des cellules glandulaires, épithéliales ou nerveuses suite notamment à une lésion tissulaire et/ou des processus inflammatoires. La transmission du message nociceptif fait également intervenir l'activation de récepteurs canaux dépendants du potentiel. On retrouve ainsi des canaux sodiques (Nav) qui sont activés par la dépolarisation membranaire et qui génèrent ou modulent les potentiels d'action à l'origine de l'excitabilité neuronale, et des canaux calciques (Cav) qui sont impliqués dans l'élaboration du potentiel d'action, dans la libération de neurotransmetteurs et dans l'expression calcium-dépendante de certains gènes. En revanche, les canaux potassiques dépendant du voltage (Kv), modulent généralement négativement l'excitabilité neuronale par leur effet hyperpolarisant. L'activation de ces différentes voies modifie la polarisation de la membrane du nocicepteur, stimule les canaux dépendants du voltage et génère des potentiels d'action. Le signal nociceptif à la périphérie est ainsi transformé en influx électrique, puis conduit par les fibres primaires A δ et C jusqu'à la corne dorsale de la ME (figure 4).

Il a été démontré que ces canaux ioniques voltage- et ligand-dépendants jouent un rôle dans les changements induits par la chimiothérapie dans les comportements nociceptifs. Il est connu que l'augmentation de l'excitabilité neuronale/axonale périphérique, qu'elle soit due à un abaissement du seuil et/ou une prolongation de l'ouverture du canal, ou liée à la surexpression de certains récepteurs, précède les symptômes chez les patients (Boyette-Davis, Walters et al. 2015).

- Les canaux TRP sont une grande famille de canaux cationiques non sélectifs, largement exprimés dans le système nerveux (Boyette-Davis, Walters et al. 2015).

La famille des TRP vanilloïdes (TRPV) a été la plus étudiée en ce qui concerne la douleur. Dans cette famille, on retrouve TRPV1, TRP-Ankryne 1 (TRPA1) et TRP-Melastatine 8 (TRPM8) qui sont exprimés dans les neurones sensoriels primaires des ganglions de la racine dorsale (DRG pour *dorsal root ganglion*) et contribuent à la douleur normale et pathologique (Chukyo et al. 2018). Des études neurobiologiques montrent qu'ils jouent un rôle crucial dans l'hypersensibilité aux stimuli thermiques et mécaniques pendant l'inflammation et les NPCI, et sensibilisent les voies de la douleur (Chukyo, Chiba et al. 2018). TRPV1, connu pour être le récepteur de la capsaïcine, est un nocicepteur impliqué dans la sensation douloureuse évoquée par un stimulus chimique (produits chimiques vanilloïdes exogènes par exemple la capsaïcine, la résinifératoxine, ainsi que par des protons) inflammatoire (divers signaux lipidiques endogènes) et thermique au chaud (supérieur à 42°C) (Amaya et al. 2003, Ro et al. 2009, Nagy et al. 2014). TRPV1 joue un rôle important dans la transduction sensorielle et la sensibilisation de l'afférence primaire. La sensation évoquée par ces stimuli lorsqu'ils sont appliqués sur la peau, est perçue comme une sensation de brûlure (Simone et al. 1989). L'expression de TRPV1 est augmentée dans les DRG de rat après l'administration de paclitaxel à un moment correspondant au début de l'hyperalgie thermique. De plus, l'utilisation d'antagonistes du TRPV1 dans un modèle de rongeur réduit l'hypersensibilité à la chaleur (Hara et al. 2013). Des augmentations de l'expression de TRPV1 dans les DRG murins et la ME ont également été observées après des traitements au bortézomib (Quartu et al. 2014), au cisplatine (Ta et al. 2010) et à l'oxaliplatine (Chukyo, Chiba et al. 2018).

TRPA1, souvent colocalisé avec TRPV1, peut être activé par divers produits chimiques nocifs (Boyette-Davis, Walters et al. 2015), mais il est également connu pour être un transducteur du froid (température inférieure à 17°C) (Obata et al. 2005, Story 2006, Laursen et al. 2014). Il a été démontré que la sensibilité au froid induite par l'oxaliplatine dans les modèles animaux était dépendante de TRPA1 (Nassini et al. 2011, Zhao et al. 2012, Yamamoto et al. 2015,

Chukyo, Chiba et al. 2018). Cette conclusion a également été tirée pour l'allodynie au froid induite par le paclitaxel (Materazzi et al. 2012), et pour l'hyperalgie thermique induite par le docétaxel (Huang et al. 2017). La possibilité demeure que TRPA1 peut être impliqué dans l'induction de la sensibilisation à long terme des nocicepteurs pendant la chimiothérapie.

Enfin, moins étudié, mais aussi un modulateur potentiellement important dans la pathogenèse des NPCI est le canal TRPM8. Ce canal est activé par des stimuli thermiques légers, entre 25 et 28 °C et chimiquement par le menthol (Peier et al. 2002). Il est connu que son expression est augmentée dans les neurones de DRG de rats, corrélée avec l'hyperalgie au froid induite par l'oxaliplatine (Gauchan et al. 2009, Chukyo, Chiba et al. 2018).

- Plusieurs études rapportent des changements dans le comportement des canaux ioniques voltage-dépendant Na^+ (Nav) suite à l'application d'agent chimiothérapique, et suggèrent qu'ils jouent un rôle dans la pathogenèse de la douleur neuropathique induite par la chimiothérapie (Nieto et al. 2008). Ainsi, les agents chimiothérapiques sont capables de rallonger la période réfractaire du nerf périphérique et de prolonger l'ouverture du canal Nav (Fehrenbacher 2015), entraînant une augmentation du courant Na^+ au niveau des neurones du DRG, provoquant un abaissement du potentiel membranaire (Adelsberger et al. 2000). L'ensemble conduit à une modification du seuil et à des décharges ectopiques dans divers neurones, qui peuvent sous-tendre les symptômes douloureux des patients souffrants de NPCI. Des modifications au niveau d'autres canaux ioniques contribuent également à l'excitabilité neuronale/axonale. Ainsi, on observe une diminution de l'expression des canaux K^+ voltage-dépendants au niveau des afférences primaires chez les rats à la suite de la chimiothérapie, dépolarisant ainsi le potentiel de repos membranaire et conduisant à une hyperexcitabilité des nocicepteurs (Busserolles et al. 2016, Viatchenko-Karpinski et al. 2018). A l'inverse, des travaux mettent en évidence cette fois-ci une augmentation de l'expression des canaux activés par hyperpolarisation (*hyperpolarization-activated channels* ou HCN), qui sont perméables à

la fois aux ions K^+ et Na^+ , et qui sont connus pour augmenter l'excitabilité des nocicepteurs et les décharges spontanées dans d'autres conditions de douleur (Descœur et al. 2011, Resta et al. 2018). Des auteurs mettent également en lumière une augmentation de l'expression de canaux calciques voltage-dépendants au niveau des neurones du DRG chez des souris à la suite de la chimiothérapie. De plus, l'administration de drogues interférant avec ces canaux, comme la gabapentine ou l'ethosuximide, réduit les réflexes hypersensibles des rongeurs suite au paclitaxel et à la vincristine (Gauchan, Andoh et al. 2009). Ces canaux calciques voltage-dépendants sont connus pour être essentiels à la transmission du signal nociceptif (Weiss et al. 2007), et semblent donc également contribuer à la NPCI.

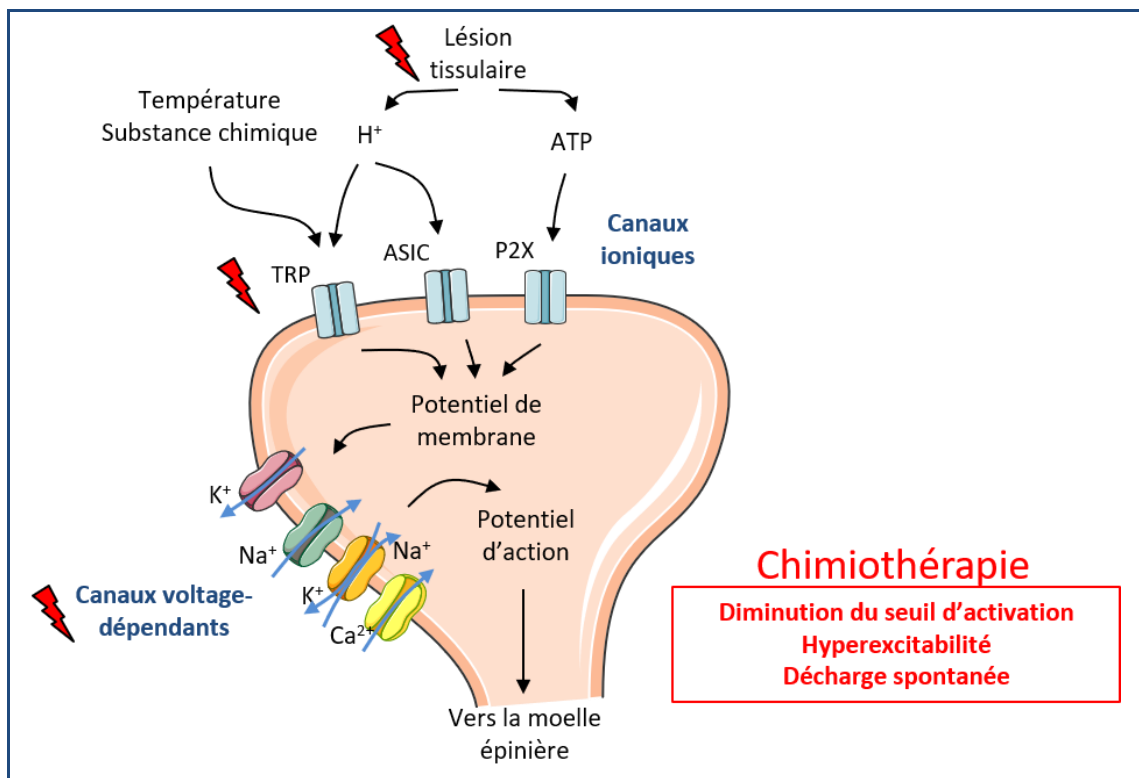


Figure 4. Déclenchement du signal nociceptif et sensibilisation par la chimiothérapie

Suite à une stimulation nociceptive thermique ou mécanique, ou suite à une lésion tissulaire, de nombreux signaux nociceptifs ou inflammatoires sont produits ou libérés. L'activation des différentes voies modifie la polarisation de la membrane du nocicepteur, stimule les canaux ioniques voltage-dépendants et génère des potentiels d'action. Le signal nociceptif à la périphérie est ainsi transformé en influx électrique, puis conduit par les fibres primaires $A\delta$ et C jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. En modifiant l'expression et/ou l'activation des canaux ioniques responsables de l'influx nociceptif nerveux, mais également en générant des processus inflammatoires, la chimiothérapie conduit à une hyperexcitabilité de la fibre nerveuse.

TRP : Transient Receptor Potential ; ASIC : Acid Sensing Ionic Channels ; P2X : récepteur purinergique

II.2.1.2 Troubles sensoriels par augmentation du message nociceptif au niveau spinal : modifications de la neurotransmission

La fibre sensorielle nociceptive transmet le message jusqu'à la corne dorsale de la ME, via le faisceau de Lissauer, où elle forme des synapses au niveau de la substance grise spinale avec les neurones de projection (ou dits de second ordre). Plusieurs études ont documenté des altérations dans les processus impliqués dans la signalisation des neurotransmetteurs à ce niveau après un traitement chimiothérapique, entraînant dès lors une cascade d'évènements aboutissant à une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs spinaux contribuant à la NPCI, résumés sur la figure 5.

Deux groupes de neuromédiateurs sont responsables de la transmission des messages nociceptifs périphériques vers les neurones spinaux. Il s'agit d'acides aminés excitateurs comme le glutamate ou l'aspartate, et de neuropeptides tels que la substance P ou le *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP). Le glutamate active deux types de récepteurs ionotropiques au niveau de la ME, à savoir les récepteurs N-méthyl-D aspartate (NMDA) et les récepteurs AMPA/Kaïnate. La substance P quant à elle joue un rôle de neuromodulateur en modulant les effets excitateurs ou inhibiteurs des neurotransmetteurs. Le CGRP est fréquemment colocalisé avec la substance P au niveau des fibres sensibles des afférences primaires, et leurs récepteurs, couplés à une protéine Gs, sont retrouvés au niveau du neurone de second ordre. Globalement, le CGRP et la substance P potentialisent les effets excitateurs du glutamate au niveau de la ME, générant ainsi un potentiel post-synaptique excitateur de plus forte amplitude. Plusieurs études révèlent que l'inhibition pharmacologique de la production de glutamate améliore les modifications de la conduction nerveuse, et reverse au niveau des neurones sensoriels des DRG les altérations morphologiques associées aux NPCI après l'administration de cisplatine, de paclitaxel et de bortézomib (Boyette-Davis, Walters et

al. 2015, Carozzi et al. 2015). De plus, l'administration d'un antagoniste des récepteurs au glutamate permet de supprimer l'hypersensibilité et les déficits de conduction nerveuse induits par le bortézomib (Ghelardini et al. 2014). Le glutamate étant un neurotransmetteur excitateur, on peut suggérer que son élimination de la synapse prévient l'excitotoxicité, et qu'à l'inverse une diminution de sa clairance par les astrocytes peut entraîner une augmentation des réponses des neurones spinaux aux stimuli nociceptifs (Boyette-Davis, Walters et al. 2015). Or, l'hyperalgie induite par le bortézomib, le cisplatine, le paclitaxel et la vincristine chez le rat est associée à une diminution de l'expression du transporteur glutamate GLAST dans les astrocytes spinaux (Cata et al. 2006, Robinson and Dougherty 2015), conduisant à des décharges prononcées des neurones spinaux (Weng et al. 2003, Cata et al. 2008). La diminution de l'expression des transporteurs du glutamate pourrait être un mécanisme commun aux NPCI (Boyette-Davis, Walters et al. 2015).

Au niveau spinal, la transmission des informations vers les centres supérieurs est également modulée et finement contrôlée par différents systèmes. Cette modulation s'exerce par la présence d'interneurones inhibiteurs essentiellement gabaergiques au niveau de la corne dorsale, mais également par l'intermédiaire de contrôles descendants, généralement sérotoninergiques et noradrénergiques, provenant des structures supra-spinales. Il s'avère que chez des rats exposés à la vincristine, on observe une augmentation de l'expression du récepteur à la sérotonine 5HT_{2A} au niveau de la ME (Thibault et al. 2008). Le récepteur 5HT_{2A} est un récepteur couplé préférentiellement à une protéine G_q. Son activation entraîne une cascade d'évènements intracellulaires ayant globalement un effet excitateur de l'activité cellulaire (Van Steenwinckel et al. 2009), et l'implique donc dans un rôle pro-nociceptif et de sensibilisation spinale. De façon intéressante, des souris *knock-out* pour ce récepteur ne développent pas d'hyperalgie mécanique induite par la vincristine. Des résultats similaires

ont été obtenus pour la neuropathie périphérique induite par la vincristine chez des souris dépourvues de transporteurs de sérotonine (Hansen et al. 2011).

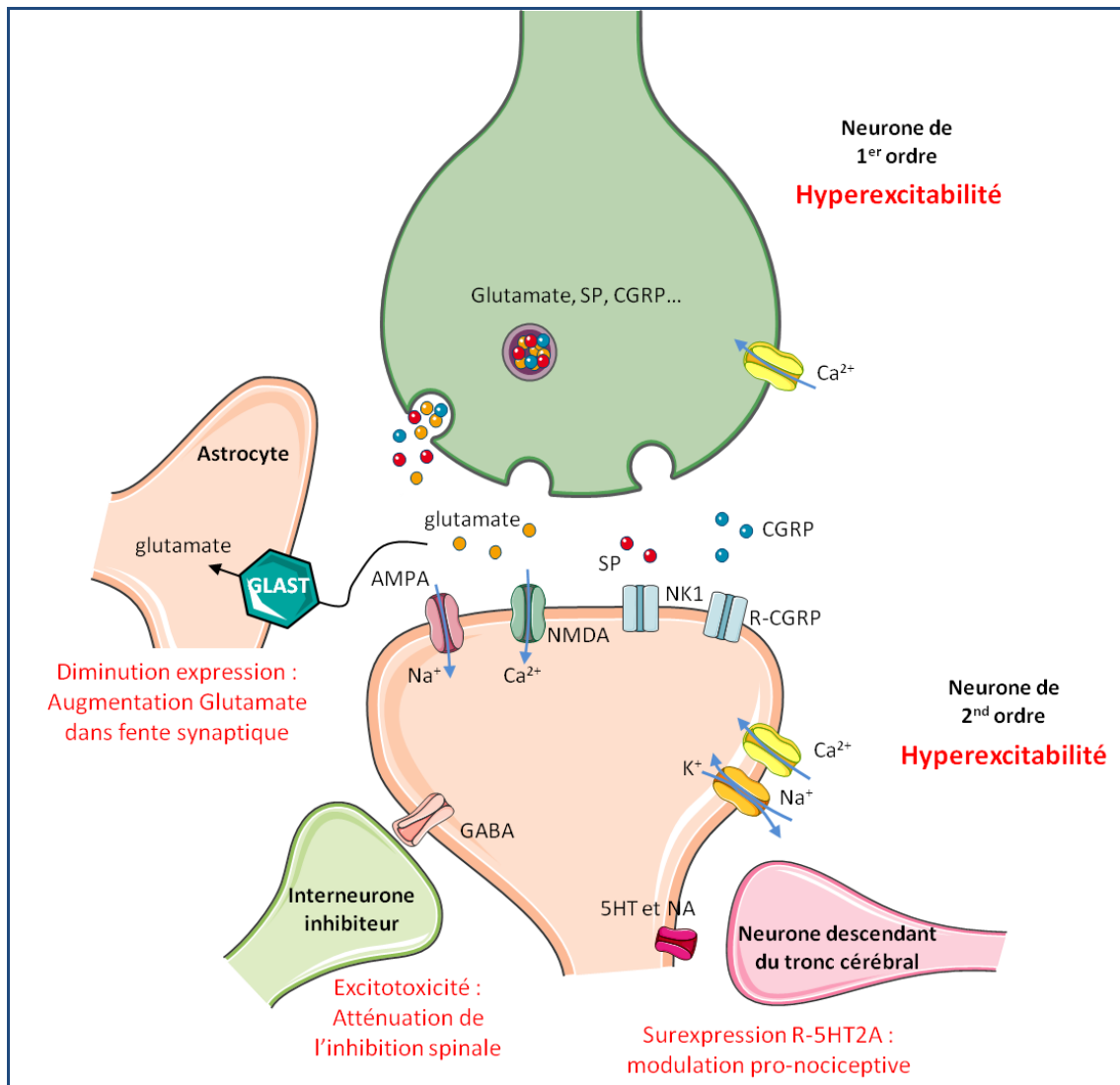


Figure 5. Transmission du message nociceptif vers les neurones spinaux de 2nd ordre et hyperexcitabilité chimio-induite

Le signal nociceptif est transformé en influx électrique grâce aux canaux sodiques dépendants du voltage activés suite à l'activation de canaux ioniques dépolarisants. Cet influx active les canaux calciques sensibles au voltage, conduisant en une entrée de Ca^{2+} . Cet influx de Ca^{2+} entraîne la fusion des vésicules synaptiques et va ainsi permettre la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs de différentes natures se fixent sur leurs récepteurs post-synaptiques, puis le signal nociceptif est transmis aux centres supérieurs intégrateurs par le tractus spino-thalamique. L'hyperexcitabilité du neurone nociceptif de projection induite par la chimiothérapie (texte rouge) est causée par divers événements, tels qu'une atténuation de l'inhibition spinale, une modulation pro-nociceptive ou encore une augmentation de Glutamate dans la fente synaptique par diminution de l'expression de son transporteur de recapture.

SP : Substance P ; CGRP : Calcitonine gene-related peptide ; GLAST : Glutamate Aspartate transporteur ; NK1 : Neurokinine 1 ; 5-HT : Sérotonine ; NA : Noradrénaline.

II.2.1.3 Toxicité cellulaires et modifications intracellulaires suite à la chimiothérapie**✓ Dommages mitochondriaux**

La plupart des récentes recherches sur les mécanismes sous-jacents à la NPCI ciblent les dommages mitochondriaux des cellules gliales et des neurones suite à la chimiothérapie. Ainsi, plusieurs modifications et altérations mitochondriales, pouvant expliquer la sensibilisation voire la mort cellulaire, ont été mises en évidence.

Des études rapportent que la chimiothérapie, notamment les taxanes, altère la localisation et le transport mitochondrial (Shprung and Gozes 2009, Shemesh and Spira 2010). Le transport et la localisation correcte des mitochondries sont importants pour le bon fonctionnement cellulaire. Ainsi les mitochondries se déplacent pour atteindre les zones de haute consommation énergétique. En effet, il a été démontré qu'un transport mitochondrial altéré est associé au stress oxydatif et au dysfonctionnement cellulaire (Stamer et al. 2002, Arendt 2003, Gotz and Riederer 2004). De plus, une mauvaise localisation mitochondriale peut entraîner une déplétion énergétique locale qui peut être la cause d'une dépolarisation membranaire, et donc de décharges spontanées qui pourraient sous-tendre les symptômes décrits chez les patients souffrant de NPCI (Shemesh and Spira 2010). Le transport d'organelles au sein de la cellule dépend fortement du cytosquelette, et se fait par transport axonal au niveau du neurone (Morris and Hollenbeck 1995), c'est pourquoi les auteurs s'accordent à dire que ces modifications dans la localisation mitochondriale sont dues à un défaut du transport axonal. En effet, beaucoup d'agents cytotoxiques ciblent les microtubules des cellules cancéreuses pour prévenir la division cellulaire, mais touchent aussi les microtubules des cellules du système nerveux. Ainsi, les taxanes endommagent le transport axonal en altérant la dynamique des microtubules du cytosquelette.

Un autre mécanisme par lequel les agents chimiothérapeutiques peuvent altérer la localisation mitochondriale et la production d'énergie est la perturbation de l'équilibre entre la fission et la

fusion mitochondriale. Les mécanismes de fission et de fusion sont des processus qui permettent le recyclage dynamique des mitochondries âgées ou endommagées. Ces phénomènes sont normaux mais augmentés/altérés suite à la chimiothérapie, ce qui entraîne une baisse de la production d'énergie et une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS), participant *in fine* à un stress oxydant (Knott and Bossy-Wetzel 2008, Voccoli and Colombaioni 2009, Fehrenbacher 2015). Une augmentation du gonflement mitochondrial est associée à des changements fonctionnels, et peut être le résultat d'une modification de la perméabilité mitochondriale (Nowikovsky et al. 2009, Zheng et al. 2012). Il a été démontré que plusieurs agents chimiothérapeutiques entraînent une modification de la perméabilité mitochondriale, et dépolarisent ainsi les mitochondries (Evtodienko et al. 1996, Andre et al. 2000, Kidd et al. 2002, Melli et al. 2008). Ces changements de perméabilité membranaire, notamment calciques, sont à l'origine de modifications morphologiques. La plupart des études reportent une modification de l'aspect des mitochondries au niveau du neurone sensoriel (axone et soma) mais également au niveau des cellules de Schwann, ou celles-ci apparaissent gonflées et vacuolées (Flatters and Bennett 2006, Xiao et al. 2012, Zheng, Xiao et al. 2012). Théoriquement, cela entraîne une diminution de la capacité des mitochondries à respirer et à générer de l'ATP pour la cellule (Flatters and Bennett 2006, Zheng et al. 2011, Xiao, Zheng et al. 2012, Zheng, Xiao et al. 2012), et augmente également la production de ROS (Batandier et al. 2004). Il est à noter que le gonflement et la vacuolisation de la mitochondrie est également un indicateur d'une dégénérescence neuronale ou axonale initiée par une fuite calcique mitochondriale (Massey, Kim et al. 2014).

Toutes ces altérations citées sont associées avec une augmentation du relargage de cytochrome C dans le cytosol (qui initie alors l'activation de caspases et active la voie apoptotique), des dommages de l'ADN mitochondrial due aux effets directs des agents

chimiothérapique et/ou indirects via la détresse mitochondriale, et une augmentation de la production de ROS conduisant à un stress oxydant (stress mitochondrial) (Carozzi, Canta et al. 2015), ce dernier étant un autre mécanisme putatif par lequel les agents chimiothérapeutiques modifient la sensibilité neuronale.

Le stress oxydatif est à la fois un catalyseur et un produit de la détresse mitochondriale. Effectivement, il a également été démontré que la chimiothérapie augmente la production de ROS et d'espèces réactives de l'azote (RNS) dans les neurones sensoriels et dans la ME (Jiang et al. 2008, Barriere et al. 2012, Doyle et al. 2012). En fait, la génération de stress nitroxydant, induite par la production de ROS et de RNS, entraîne la sensibilisation des neurones nocicepteurs sensoriels (Ridger et al. 1997, Ferrari et al. 2011). Ces ROS et RNS induits par la chimiothérapie sont générés par les neurones, les cellules satellites et les cellules inflammatoires (Hamanaka and Chandel 2010). Les générateurs intracellulaires de ROS et RNS comprennent les mitochondries, via la chaîne de transport d'électrons et une incidence accrue de la fission mitochondriale, et une activité accrue de la NADPH oxydase membranaire (Jiang, Guo et al. 2008). Malheureusement, le stress nitroxydatif peut compromettre la survie et la fonction cellulaire en causant des dommages à l'ADN, la démyélinisation des fibres nerveuses, des dommages et des dysfonctionnements mitochondriaux, l'activation de voies de transduction et la mort cellulaire par apoptose (Fehrenbacher 2015). De plus, les ROS générés par la mitochondrie peuvent activer des voies pro-inflammatoires, contribuant également à la NPCI chronique (Kerckhove, Collin et al. 2017).

✓ **Dommages nucléaires**

En prenant en compte les mécanismes d'action de certains agents antinéoplasiques pour lutter contre les cellules tumorales, en plus des dommages indirects sur l'ADN mitochondrial et cellulaire lié au stress oxydant, certains agents chimiothérapeutiques ciblant directement

l'ADN, notamment les sels de platine, peuvent directement causer des dégâts au niveau nucléaire. Les neurones sensoriels, dont le corps cellulaire est situé dans les DRG, sont particulièrement vulnérables aux dommages neurotoxiques, expliquant en partie les principaux symptômes sensoriels caractérisés dans la NPCI. Les sels de platine sont connus comme pouvant s'accumuler au niveau du DRG via une voie de passage pour les sels de platine constituée par les transporteurs OCT2 (Taleb, Bouzobra et al. 2017). Les sels de platine induisent des dommages par le biais de l'établissement de ponts dans l'ADN, exerçant des changements toxiques du noyau des neurones sensoriels des DRG. Ce mécanisme induit ainsi des dysfonctionnements dans la machinerie transcriptionnelle, et peut aboutir à la mort neuronale. Les taxanes et les alcaloïdes semblent également s'accumuler au niveau des DRG dans des modèles animaux, produisant ainsi des anomalies nucléaires (Carozzi, Canta et al. 2015).

✓ **Altérations de la signalisation intra cellulaire**

Certaines études évoquent que la signalisation de la voie des caspases contribue au NPCI par sa relation avec les dommages mitochondriaux et la neurotoxicité des cellules du DRG qu'elle entraîne. L'activation de protéines kinases et des caspases se produit au cours de diverses formes de stress cellulaire, et en réponse à des facteurs de croissance et des cytokines. L'activation de ces enzymes peut entraîner des dommages mitochondriaux et une apoptose dans les neurones et les cellules gliales.

Les modèles animaux indiquent que la chimiothérapie active la voie de la caspase 10, entraînant des dommages mitochondriaux et par la suite la génération de ROS, ainsi que l'apoptose potentielle du neurone (Joseph and Levine 2004). D'autres études montrent également que l'utilisation d'inhibiteurs de la caspase réduit l'hypersensibilité et la perte cellulaires des neurones du DRG induite par différents agents chimiothérapeutiques chez le rat (Joseph and Levine 2004, Ta et al. 2006).

L'activation des voies de la protéine kinase, en particulier des kinases de la famille MAPK, peut contribuer davantage aux dommages cellulaires. Par exemple le cisplatine et l'oxaliplatine activent p38 MAPK et Erk1/2, et favorisent ainsi l'apoptose des neurones du DRG (Scuteri et al. 2009). L'activation de ces voies influence un certain nombre d'événements en aval qui pourraient promouvoir davantage la NPCI, y compris la libération de cytokines et les dommages aux structures cellulaires.

II.2.1.4 Processus inflammatoires : dommages, sensibilisation et douleur

Il est connu que les processus de neuro-inflammation, processus dynamiques mettant en jeu de multiples acteurs et divers médiateurs, sont impliqués dans plusieurs modèles de douleur neuropathique (Kroemer et al. 2013), y compris la lésion traumatique du nerf (Peters et al. 2007) et la neuropathie diabétique (Chen et al. 2016). Des preuves émergentes lui suggèrent également un rôle de plus en plus évident dans la physiopathologie de la NPCI, notamment en conduisant à des dommages et à une sensibilisation de la fibre nerveuse (Lees, Makker et al. 2017, Makker, Duffy et al. 2017). En effet, la chimiothérapie est responsable de la libération de facteurs biochimiques à l'origine de processus inflammatoires venant activer ou prolonger l'activation des nocicepteurs, et surtout d'induire une sensibilisation et une amplification de leur réponse. L'inflammation entraîne la libération de substances dont un bon nombre sont neuroactives. Les ions potassique K^+ , les protons H^+ , l'ATP issus des cellules immunitaires ainsi que la bradykinine sont des substances excitatrices qui peuvent directement activer les nocicepteurs, et conduire à une douleur spontanée. Les autres substances dites algogènes (qui induisent et maintiennent une douleur) sont avant tout sensibilisatrices, où la sensibilisation est caractérisée par un abaissement du seuil de dépolarisation de la fibre sensorielle, provoquée par une modification de la perméabilité aux ions des canaux ioniques. La sensibilisation relate donc l'augmentation de l'excitabilité de la

fibre nerveuse, qui devient hypersensible aux diverses stimulations (température, toucher, pincement...), et qui conduit à des réponses sensorielles exacerbées et engendrent des douleurs chroniques.

Il existe une multitude de substances chimiques très diverses, participant à cette « soupe inflammatoire », qui interagissent entre elles et qui modulent l'activité des nocicepteurs. Les substances algogènes peuvent être formées localement ou être circulantes, et proviennent des cellules lésées (H^+ , ATP, monoxyde d'azote NO, lactate...), des cellules du système immunitaire (plaquettes, polynucléaires, lymphocytes, macrophages, mastocytes – histamine, sérotonine, cytokines, facteurs de croissance...) et des nocicepteurs eux-mêmes (substance P, CGRP...). L'amplification du message et de l'inflammation est assurée non seulement par les substances libérées au sein du foyer inflammatoire, mais également par le biais d'un recrutement supplémentaire de fibres adjacentes activées ou sensibilisées, notamment par le phénomène de reflexe d'axone. C'est ce qu'on appelle l'inflammation neurogène.

II.2.1.4.1 Les acteurs de la neuro-inflammation

Les agents chimiothérapeutiques exercent des effets immuno-modulateurs systémiques qui, à des doses thérapeutiques, conduisent souvent à des effets transitoirement immuno-suppressifs due à l'activité cytotoxique ciblant les cellules immunitaires qui se divisent rapidement (Lees, Makker et al. 2017). Mais les agents chimiothérapeutiques peuvent également provoquer une neuro-inflammation par l'activation de ces dernières (Zitvogel et al. 2008). Des travaux confirment que les agents chimiothérapeutiques induisent l'activation de cellules de l'immunité innée tels que les macrophages (Moalem and Tracey 2006), mais aussi améliorent l'activité de cellules du système immunitaire adaptatif, comme les lymphocytes T et B, au niveau du sang périphérique (Lees, Makker et al. 2017). Il a été démontré dans des

modèles murins que la chimiothérapie augmente le nombre de macrophages dans le DRG et dans le tissu nerveux, mais également augmente leur activité (Peters, Jimenez-Andrade et al. 2007, Kiguchi et al. 2008, Liu et al. 2016). De plus, une récente étude démontre qu'il y a également une augmentation de l'infiltration de neutrophiles, qui sont des cellules immunitaires ayant également la propriété de phagocytose, dans le DRG après injection de paclitaxel chez la souris (Liu et al. 2014). Le lien neuro-inflammation et physiopathologie des NPCI est également vu par l'utilisation de drogues connues pour supprimer l'activation des cellules immunitaires, qui empêchent l'hypersensibilité douloureuse dans les modèles animaux de NPCI (Lees, Makker et al. 2017). Enfin, des travaux ont mis en évidence l'implication des granulocytes mastocytes (cellules régulatrices participant à la signalisation et à la communication cellulaire pour coordonner la réponse immunitaire) dans la genèse de l'allodynie mécanique provoquée par l'oxaliplatine, puisque celle-ci est absente chez les souris déficientes en mastocytes (Sakamoto et al. 2016). On observe également une augmentation du nombre de cellules T-CD4+, B- et T-CD8+ infiltrantes au niveau du DRG d'animaux traités au paclitaxel, et une diminution de l'expression des lymphocytes T anti-inflammatoire (Liu, Zhang et al. 2014). De plus, dans cette même étude, l'administration intrathécale d'un anticorps neutralisant le CD8 permet de diminuer l'allodynie mécanique induite par le paclitaxel chez les souris (Liu, Zhang et al. 2014).

Le système immunitaire n'est pas le seul acteur dans le relargage de médiateurs de l'inflammation ; les neurones et les cellules gliales activées participent activement à la neuro-inflammation via la sécrétion de médiateurs qui augmentent l'excitabilité neuronale et génèrent une hypersensibilité à la douleur (Dubovy et al. 2014, Zhang et al. 2016). Ainsi, des changements au niveau des cellules de Schwann, des cellules satellites dans le DRG et des astrocytes dans la ME semblent être un important composant de la NPCI, et contribuent à la douleur neuropathique en sensibilisant et/ou en activant les nocicepteurs (Moalem and Tracey

2006). Les cellules de Schwann et les cellules satellites du DRG répondent à la chimiothérapie par des reprogrammations et des modifications phénotypiques qui leur permet de sécréter des médiateurs de l'inflammation (Dubovy, Klusakova et al. 2014, Jessen and Mirsky 2016). Ces médiateurs ainsi sécrétés peuvent non seulement augmenter l'excitabilité neuronale et générer une hypersensibilité à la douleur, mais permettent également de recruter des cellules infiltrantes, tels que les macrophages, et activent ainsi le système immunitaire tout en ajoutant une source supplémentaire de médiateurs inflammatoires (Dubovy, Klusakova et al. 2014, Jessen and Mirsky 2016). La microglie (cellules *macrophage-like*) et les astrocytes de la ME sont également impliqués dans le développement de la douleur neuropathique due à leurs effets inflammatoires, et jouent ainsi un rôle dans la neuro-inflammation induite par la chimiothérapie (Watkins and Maier 2002, Hald 2009, Gosselin et al. 2010). Beaucoup d'études sur la NPCI démontrent une augmentation à long terme de l'activation astrocytaire dans la ME en lien avec une augmentation de la production et de la sécrétion de cytokines (Clark et al. 2013, Ji et al. 2013).

II.2.1.4.2 Les médiateurs de la neuro-inflammation : les cytokines et les chimiokines

Les cytokines, les chimiokines et leurs effets sont bien connus dans le rôle de plusieurs formes de douleur. Ces cytokines peuvent se fixer à leur récepteur localisé sur les neurones et les cellules gliales pour modifier les voies de la douleur, et en retour augmenter l'expression de cytokines de ces mêmes cellules, entraînant ainsi des cascades de réactions en cycle auto-entretenues (Lees, Makker et al. 2017). Les cytokines peuvent augmenter la douleur par de nombreuses façons au niveau du SNP : au niveau des neurones du DRG et de la corne dorsale de la ME, les cytokines peuvent conduire à une sensibilisation directe qui entraîne des décharges spontanées de la fibre (Wang, Lehy et al. 2012). De plus, certaines cytokines, en particulier le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF- α), sont connus pour diminuer la signalisation inhibitrice GABAergique dans la ME par la voie de signalisation MAPK (p38) et

augmente ainsi la signalisation du message douloureux (Wang, Lehty et al. 2012). Il est également connu que le TNF- α est capable d'augmenter la conductance membranaire sodique dépendant du voltage, et potassique de façon non voltage dépendant cette fois-ci, ce qui entraîne une hyperexcitabilité neuronale et contribue donc la douleur neuropathique (Jin and Gereau 2006, Czeschik et al. 2008, Leung and Cahill 2010). Les cytokines peuvent aussi conduire indirectement à des réponses inflammatoires en induisant le relargage par les cellules immunitaires et par les nocicepteurs eux-mêmes de bradykinine, de sérotonine, d'histamine ou de substance P, contribuant à la sensibilisation et pouvant activer les voies apoptotiques dans les cellules, contribuant ainsi à la douleur (Le Bars and Adam 2002) ; c'est notamment le cas du TNF- α qui, via le récepteur TNFR1, conduit à l'apoptose par signalisation de la voie des caspases (Micheau and Tschopp 2003, Thorburn 2004).

Il est connu que la surproduction chronique de cytokines après une lésion nerveuse traumatique ou d'autres maladies nerveuses est impliquée dans l'élaboration et le maintien d'une douleur neuropathique, et de nombreuses études pré-cliniques impliquent la signalisation de cytokines dans le processus pathologique de la NPCI (Uceyler et al. 2007, Dubovy, Klusakova et al. 2014). La plupart des études montrent une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF- α , l'interleukine (IL) 1-beta (IL-1b) et l'IL-6, accompagnée d'une réduction dans l'expression des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) dans le DRG et la ME à la suite de la chimiothérapie (Ledeboer et al. 2007, Burgos et al. 2012, Doyle, Chen et al. 2012, Janes et al. 2015). Globalement, ces résultats indiquent que l'expression de cytokines pro-inflammatoires est généralement augmentée dans le SNC et le SNP après le traitement chimiothérapique dans les différents modèles rongeurs (Lees, Makker et al. 2017). Le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 sont associés au développement de la douleur neuropathique dans différents modèles animaux. De plus, toujours dans des modèles de douleur neuropathique, le TNF- α a été démontré comme le

leader de l'activation en cascade d'autres cytokines, notamment de l'IL-1-beta, de l'IL-6 et de l'IL-8 (Leung and Cahill 2010). Les chimiokines sont des cytokines aux propriétés chimiotactiques qui contrôlent la migration et le positionnement des différentes populations de leucocytes. A ce titre il est connu que ces protéines jouent un rôle critique dans l'activation des cellules gliales et des macrophages, ainsi que dans l'infiltration tissulaire de ces derniers dans plusieurs conditions de douleur neuropathique. Plusieurs études démontrent que la chimiothérapie entraîne une élévation de l'expression de ces cytokines. Pour exemple, on observe une régulation positive de l'expression des chimiokines incluant la chimiokine ligand 2 (*chemokine ligand 2* ou CCL2), encore appelée *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1) et de la chimiokine motif C-X3-C ligand 1 (CX3CL1) dans les neurones sensoriels (Huang et al. 2014, Zhang, Li et al. 2016). Ce phénomène permet le recrutement et l'activation des macrophages, et est fortement lié au développement de l'hypersensibilité à la douleur (Pevida et al. 2013, Zhang and Dougherty 2014). L'expression de CX3CL1 est principalement augmentée au niveau du DRG, et l'utilisation d'un anticorps neutralisant la signalisation de CX3CL1 inhibe l'infiltration des macrophages, l'apoptose neuronale et l'allodynie mécanique induits par le paclitaxel (Huang, Li et al. 2014). CX3CL1 active également les macrophages, portant le récepteur CX3CL1-R, infiltrés dans le nerf sciatique de souris traitées à la vincristine, provoquant la production de ROS et l'activation de canaux TRPA1 dans les nerfs sensoriels, conduisant à la signalisation d'un message nociceptif (Old et al. 2014).

Chez l'Homme, les dosages de cytokines et de chimiokines sont principalement limités au sérum ou au plasma. Certaines études montrent que la chimiothérapie entraîne un relargage massif de TNF- α dans le sérum des patients (Eisen et al. 2000, Leung and Cahill 2010), et une étude suggère que les niveaux d'IL-6 et de son récepteur soluble l'IL-6R (sIL-6R) sont significativement plus élevés après la fin de la chimiothérapie chez des patientes atteints de cancer du sein souffrant de NPCI douloureux par rapport à celles sans NPCI (Starkweather

2010). Enfin, des preuves sont encore nécessaires pour établir une relation causale entre les niveaux de cytokines systémiques après la chimiothérapie et le développement des symptômes de la NPCI.

II.2.2. Processus physiopathologiques impliqués dans les atteintes centrales

Les données issues de l'imagerie et des études animales soutiennent l'hypothèse selon laquelle la chimiothérapie affecte la structure et la fonction cérébrale, et commencent à fournir des preuves pour les mécanismes candidats du déclin cognitif induit par la chimiothérapie. L'étiologie exacte des déficits cognitifs n'est pas connue, mais plusieurs hypothèses sont suggérées. D'abord, le SNC étant isolé et protégé par une barrière étanche protectrice, la BHE, certains auteurs supposent que la chimiothérapie, de façon directe ou non, altère l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de cette barrière protectrice la rendant plus perméable, et rendrait alors vulnérable certaines populations cellulaires, notamment à division rapide, du SNC à la chimiothérapie directement. Nous pouvons également imaginer que la BHE reste intègre et normalement fonctionnelle, mais que la chimiothérapie entraîne une inflammation en périphérie, dont les médiateurs iraient au niveau du SNC et activeraient la glie et le système immunitaire coupables de la toxicité centrale, bien que ces deux mécanismes puissent être concomitants et intriqués.

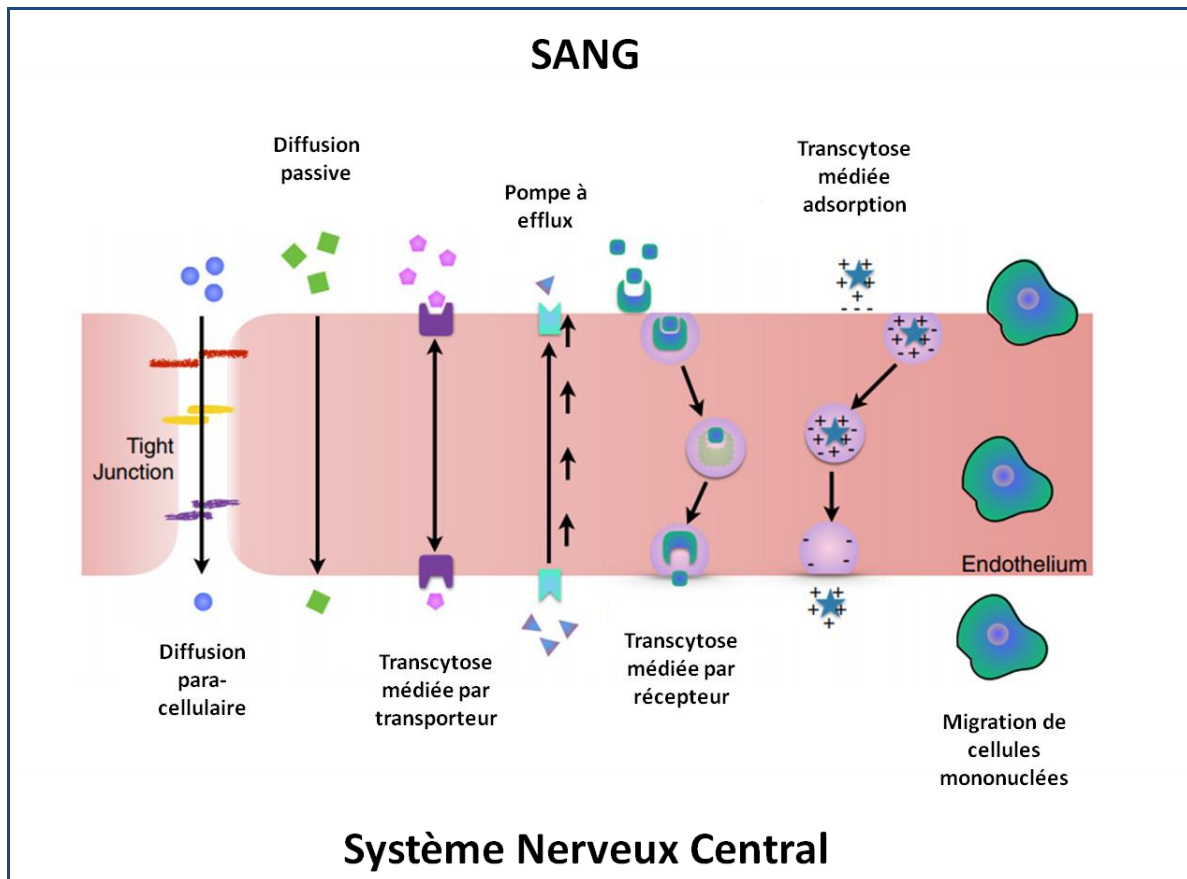
II.2.2.1 La barrière hémato-encéphalique (BHE)

✓ Fonction et Anatomie de la BHE

L'encéphale nécessite un milieu stable pour son fonctionnement optimal. La BHE, dont les différentes voies de passage sont représentées sur la figure 6, est un filtre extrêmement sélectif et de passage obligatoire où les gaz (oxygène et dioxyde de carbone) ainsi que les substances liposolubles et l'alcool peuvent librement la traverser selon leur gradient de

concentration, alors que les molécules polaires (ionisées, hydrophiles) ne peuvent diffuser que grâce à des mécanismes de transport actifs qui font appel à des canaux et des pompes spécifiques.

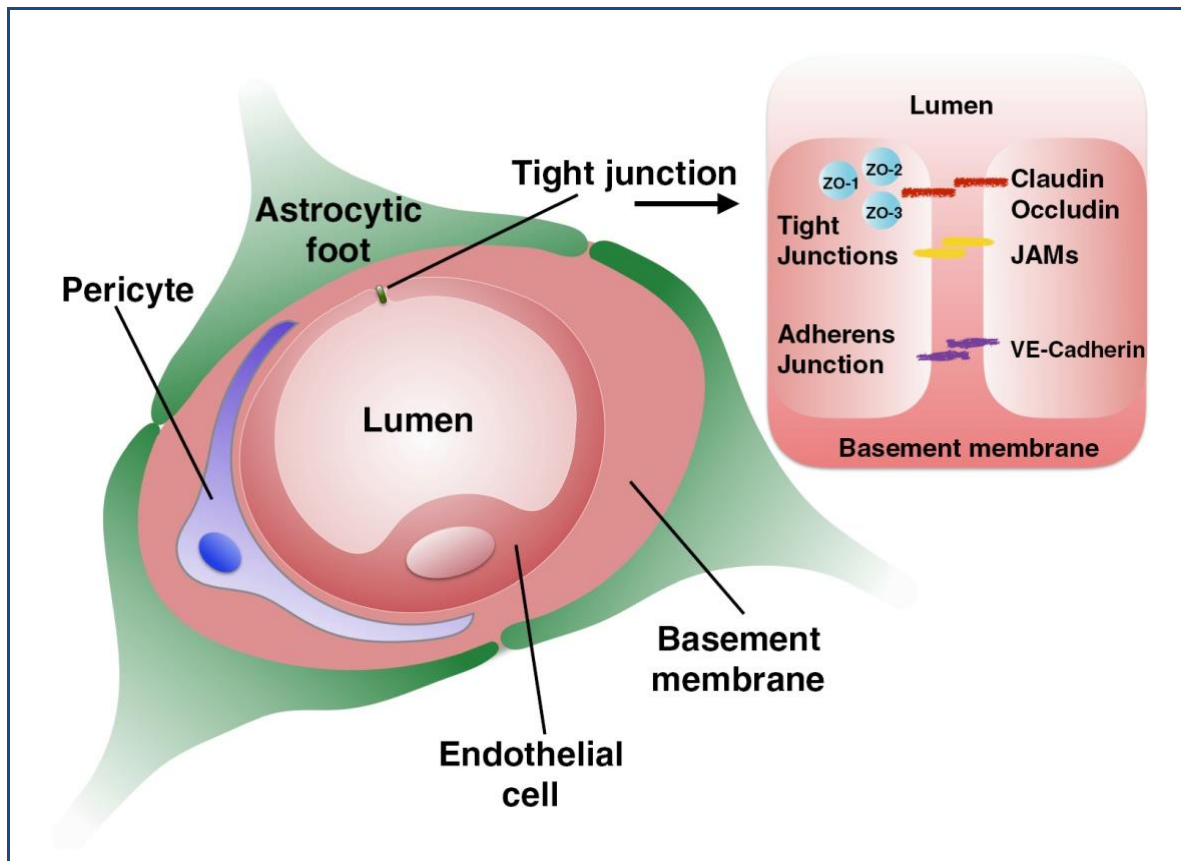
Figure 6 : Représentation schématique des voies de passage à travers la BHE (Theodorakis et al. 2017)



La BHE, schématisée sur la figure 7, est tout d'abord une barrière physique, qui contrôle étroitement les échanges entre le sang et le compartiment cérébral, composée de trois éléments : **(i) De cellules endothéliales**, constituant les vaisseaux sanguins cérébraux, différentes de celles du reste du corps. Elles sont caractérisées par une faible activité de micropinocytoses (Abbott et al. 2010, Knowland et al. 2014), par l'absence de fenestration, et par la présence de complexes de jonction. Ces complexes de jonction comportent des

jonctions serrées (*Tight junctions* ou TJ) et des jonctions adhérentes (AJ) qui participent fortement à l'étanchéité de la BHE. De façon plus détaillée, les TJ sont constituées de protéines membranaires telles que les claudines, les occludines et des molécules jonctionnelles adhérentes (*junction adherent molecules* ou JAM), mais aussi de protéines accessoires cytosoliques (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cinguline). Les JA sont composées quant à elles de complexes cadherine-caténine et de leurs protéines associées. Enfin, les protéines cytosoliques se lient au cytosquelette, créant ainsi un maillage rendant le passage paracellulaire contrôlé et étanche. **(ii)** De cellules musculaires lisses enchâssées dans la membrane basale, les **péricytes**, qui forment une population cellulaire plutôt hétérogène et dynamique, et dont l'expression des marqueurs de surface varie en fonction de la différenciation cellulaire et du tissu où ils se trouvent. Très peu étudiés, ils sembleraient être impliqués dans diverses tâches neurovasculaires, notamment en contribuant à la stabilité du vaisseau sanguin via la régulation du diamètre capillaire et du flux sanguin, et permettent le contrôle de l'intégrité de la BHE (Obermeier et al. 2013). **(iii)** De **pièdes astrocytaires** qui fournissent un soutien structurel, en se joignant les uns aux autres constituant alors « un bouclier » contre tout passage d'éléments, mais également un soutien fonctionnel à la BHE via la sécrétion de médiateurs et de facteurs neurotrophiques (IL-6, APOE2 et 3, angiopoïétine 1, Sonic hedgehog, le facteur neurotrophique dérivé de la glie ou GDNF, le facteur de croissance des fibroblastes 2 ou FGF2...) impliqués dans la maintenance et l'intégrité de la BHE (Abbott 2002, Obermeier, Daneman et al. 2013, Wang and Lai 2014).

Figure 7 : Représentation schématique de l'anatomie de la BHE (Theodorakis, Muller et al. 2017)



En plus de former véritablement une barrière physique, la BHE constitue une barrière métabolique entre le sang et le parenchyme cérébral. En effet, les cellules endothéliales qui la composent expriment et secrètent des enzymes, telles que la monoamine oxydase (MAO) ou la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), capables d'hydrolyser des substrats susceptibles d'être toxiques pour le SNC (Gosselet et al. 2011). Ces mêmes cellules endothéliales expriment également des pompes d'efflux appartenant à la famille des transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC transporteurs) qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. On retrouve ainsi les protéines de la famille des *multidrug resistance-associated proteins* (MRP) qui permettent l'efflux de certaines substances, les empêchant ainsi d'atteindre le SNC. Par exemple, il a été démontré que la protéine MRP2 est à l'origine du retour des drogues anticancéreuses (méthotrexate, cisplatine, doxorubicine et épirubicine) dans la circulation

sanguine (Borst et al. 2000) ; par ailleurs, MRP1 permet de façon générale de transporter les agents chimiothérapeutiques appartenant à la famille des alcaloïdes et des anthracyclines (Borst, Evers et al. 2000). La glycoprotéine P (P-gp), aussi connue sous le nom de MDR1, peut quant à elle transporter activement une grande variété de molécules amphipathiques hydrophobes hors de la cellule (Schinkel 1999), et est d'ailleurs un obstacle important empêchant l'entrée de drogues dans le SNC (Fellner, Bauer et al. 2002).

✓ **BHE et chimiothérapie**

Le 5-fluorouracil (5-FU) montre une capacité à traverser la BHE par diffusion passive, lui permettant d'affecter le SNC lorsqu'il est administrée par voie systémique (Wigmore et al. 2010). Ce phénomène a également été observé chez des primates, avec des taux détectables de 5-FU dans le liquide céphalorachidien après son administration intraveineuse (Schinazi et al. 1992). Une étude révèle également, après examination des concentrations de platine chez les musaraignes musquées, la présence de cisplatine au niveau de l'encéphale et de la ME, qui pourrait alors potentiellement contribuer aux effets secondaires neurologiques du cisplatine (Eiseman et al. 2015). Bien que les concentrations thérapeutiques efficaces pour les malignités du SNC n'aient pas été observées, les concentrations médicamenteuses semblent être suffisantes pour induire des lésions neuronales associées. Outre ces quelques études, les analyses montrent que la plupart des agents chimiothérapeutiques ne franchissent pas la BHE, ou atteignent des concentrations relativement très faibles dans le SNC normal, due à la BHE (Stewart 1994, Fellner, Bauer et al. 2002, Pardridge 2007, Venishetty et al. 2013). Par exemple, une étude de van der Veldt montre que l'absorption du docétaxel dans l'encéphale normal est très faible chez les patients cancéreux (van der Veldt et al. 2010). Le paclitaxel a également été démontré comme ne franchissant pas la BHE (Fellner, Bauer et al. 2002).

Ainsi, une première hypothèse est de suggérer que les agents chimiothérapiques conduisent directement et/ou indirectement à une perte de l'intégrité fonctionnelle et/ou structurelle de cette barrière protectrice, qui rend alors possible l'effet toxique direct des anticancéreux sur les diverses populations cellulaires du SNC. D'autres études proposent également que les agents cytotoxiques entraînent une réponse inflammatoire périphérique, causant alors une toxicité au niveau du SNC indirectement via les voies de cytokines pro-inflammatoires (Cheung et al. 2013). Ces deux théories sont présentées et résumées sur la figure 8.

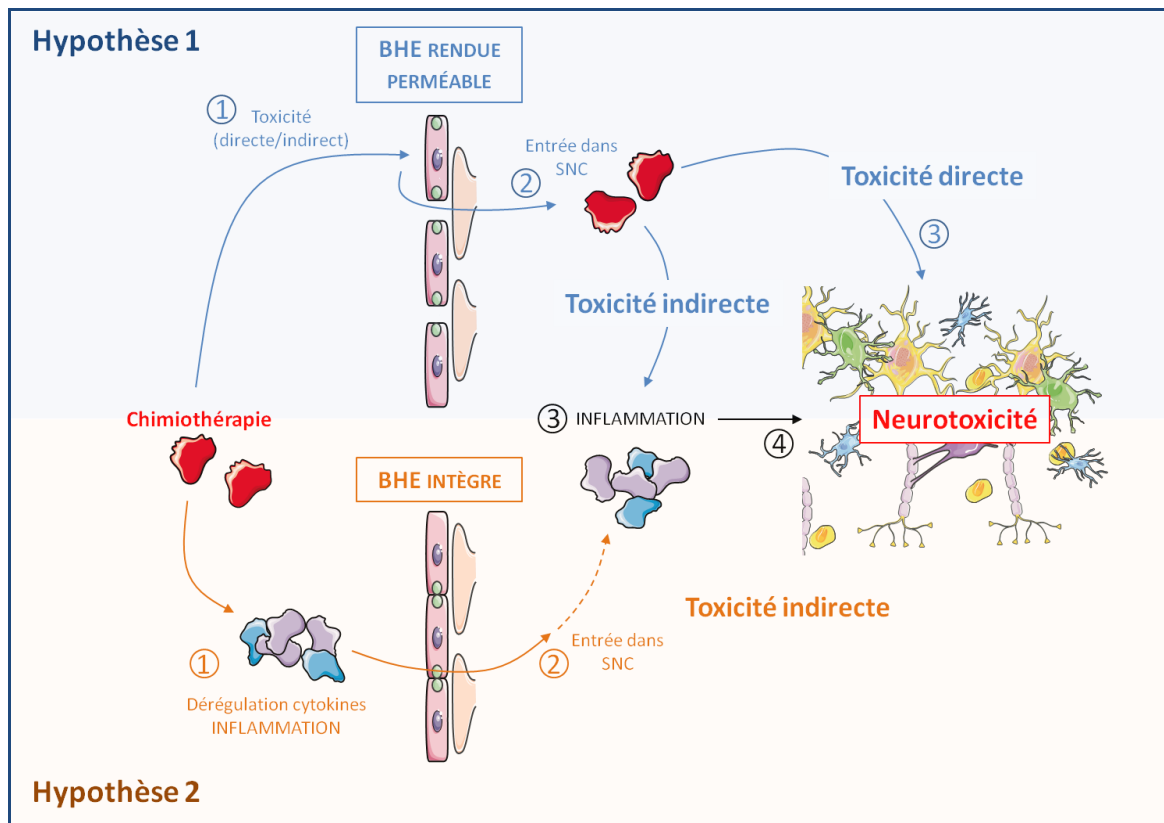


Figure 8 : Mécanismes possibles dans l'atteinte centrale par la chimiothérapie

Deux hypothèses concernant la cytotoxicité centrale induite par la CNA. La première (Hypothèse 1) est basée sur la modification de l'intégrité fonctionnelle et/ou structurelle de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui devient de ce fait perméable à la suite de la chimiothérapie (circuit bleu). Les agents antinéoplasiques accèdent au système nerveux central, et entraînent une neurotoxicité directe et/ou indirecte notamment au niveau des cellules prolifératives, résultant à terme à des déficits cognitifs. La deuxième hypothèse (Hypothèse 2) est basée sur le fait que les agents chimiothérapiques ne franchissent pas la BHE (circuit orange), mais entraînent la production de facteurs pro-inflammatoires en périphérie qui pénètrent le SNC. Ceci résulte alors en une neuro-inflammation chronique conduisant à une neurotoxicité sous-jacente aux déficits cognitifs.

- **Hypothèse 1 : Perte de l'intégrité de la BHE suite à la chimiothérapie**

Il existe peu d'études sur l'évaluation de la perturbation de la BHE suite aux agents chimiothérapeutiques ainsi que sur les mécanismes mis en jeux. La perte de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de la BHE pourrait s'expliquer à différents niveaux.

En premier lieu, les cellules endothéliales constituant la BHE pourraient être atteintes. Effectivement, des études révèlent un lien entre chimiothérapie et toxicité vasculaire (Wefel et al. 2004). Le docétaxel notamment facilite les dysfonctionnements endothéliaux à travers la production de ROS faisant suite à un stress oxydant chimio-induit, conduisant ainsi à des dommages de l'ADN et *in fine* à l'apoptose des cellules endothéliales via l'activation de la voie des caspases (Hung et al. 2015). Il a également été suggéré que l'épirubicine causerait également un stress oxydant endommageant les cellules endothéliales via l'activation de la voie p38 (Yamada et al. 2012). Les dommages de la BHE via un stress oxydant est un phénomène commun dans les maladies neurologiques incluant la sclérose amyotrophique latérale ou encore la sclérose en plaques (Obermeier, Daneman et al. 2013).

Ensuite, l'augmentation de la perméabilité de la BHE pourrait être sous-tendue par une perte ou des modifications au niveau des jonctions serrées de ces mêmes cellules endothéliales, modifiant ainsi le passage paracellulaire à travers la barrière protectrice. En effet, il a été montré que la chimiothérapie conduit à l'élaboration de processus inflammatoires (production de cytokines) qui s'avèrent être délétères pour les jonctions serrées de la BHE, causant ainsi des cassures partielles (Wang et al. 2014, Ren et al. 2017).

Enfin, bien qu'aucune étude n'ait été faite dans ce sens là, on peut également imaginer que la chimiothérapie entraîne des modifications de l'expression de certains gènes, notamment ceux codants pour les pompes à efflux, et entraverait alors le reflux des molécules toxiques vers le compartiment sanguin, augmentant ainsi le passage transcellulaire à travers la BHE.

- **Hypothèse 2 : Théorie de l'inflammation périphérique suite à la chimiothérapie**

Il est bien connu que la chimiothérapie peut entraîner des changements physiologiques, comme une augmentation du stress oxydant et/ou la production de cytokines pro-inflammatoires en périphérie, qui pourraient alors agir sur le SNC à travers une grande variété de mécanismes. A l'heure actuelle, peu d'études ont cherché à faire le lien entre cytokines et chimiothérapie chez les patients, mais des évidences émergentes indiquent que la chimiothérapie serait associée à l'augmentation de cytokines, qui elle-même est toujours associée à une diminution de l'habileté à apprendre, ainsi qu'à des altérations de la mémoire de travail et des capacités cognitives (Gahtan and Overmier 2001, Sparkman et al. 2006, Ren, St Clair et al. 2017). Quelques études relatent par exemple que la doxorubicine entraîne une augmentation de TNF- α dans le sérum des patientes, en lien avec des troubles cognitifs (Hayslip et al. 2015). Le paclitaxel et le docétaxel ont également été montrés comme liés à l'augmentation d'IL-6, d'IL-8, d'IL10 et de TNF- α (Penson et al. 2000, Tsavaris et al. 2002, Pusztai et al. 2004).

La BHE peut transporter sélectivement plusieurs cytokines à travers le SNC. Cela comprend l'IL-1 (Banks et al. 1989, Banks et al. 1993, Banks et al. 1994, Banks 2004), l'IL-6 (Banks, Kastin et al. 1994), le TNF- α (Gutierrez et al. 1993, Osburg et al. 2002, Pan et al. 2003, Pan et al. 2006) ou encore le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) (Pan et al. 2000, Pan et al. 2011). Ces cytokines sont capables de pénétrer la BHE soit par diffusion passive ou plus généralement par endocytose médiée par des récepteurs (Pan, Kastin et al. 2003, Banks and Erickson 2010, Lacourt and Heijnen 2017, Ren, St Clair et al. 2017). Les cytokines ainsi transportées jouent un rôle important dans les réponses physiologiques à l'inflammation (signalisation et régulation), à la neuro-régénération en modulant les fonctions cellulaires gliales et neuronales et interviennent également dans le métabolisme de la dopamine et de la sérotonine (Pan, Stone et al. 2011). Bien qu'elles soient importantes pour le bon

fonctionnement du SNC, elles jouent également un rôle crucial dans le développement des changements cérébraux et des déficits cognitifs suite à la chimiothérapie (Ren, St Clair et al. 2017). Ces cytokines au niveau du SNC activent les cellules microgliales et les astrocytes qui secrètent en retour des médiateurs pro-inflammatoires conduisant notamment à la migration de cellules immunitaires (Hanisch and Kettenmann 2007). Les cytokines induisent également un stress oxydant conduisant à des dommages cellulaires associés aux déficits cognitifs (Osburg, Peiser et al. 2002, Tangpong et al. 2006, Lacourt and Heijnen 2017). Cette neuro-inflammation au niveau du SNC est suggérée comme l'un des principaux conducteurs des symptômes neurotoxiques (Vichaya et al. 2015, Lacourt and Heijnen 2017).

La cytotoxicité directe des agents de chimiothérapie et les mécanismes de neuro-inflammation se produisent très probablement de concert. Il est bien établi qu'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires ont des effets délétères sur les jonctions serrées, et par conséquent sur l'intégrité de la BHE. Par exemple, l'IL-1 ou encore l'IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires qui agissent à la fois sur les cellules endothéliales et sur les astrocytes, et augmentent la perméabilité de la BHE (Wang, Jin et al. 2014), permettant ainsi la pénétration de la chimiothérapie au niveau du SNC et entraînant une amplification de la neurotoxicité et des symptômes cognitifs.

II.2.2.2 Toxicité des cellules cérébrales suite à la chimiothérapie

Divers mécanismes peuvent expliquer la neurotoxicité de la chimiothérapie au sein des populations cellulaires du SNC, en particulier de cellules sensibles et vulnérables, que ce soit de façon directe ou non. En premier lieu, le principal mécanisme d'action des agents antinéoplasiques pour lutter contre les cellules cancéreuses repose sur la toxicité des cellules en prolifération rapide. On peut alors suggérer, notamment si ces drogues atteignent le SNC,

que les cellules souches prolifératives hippocampiques, et par conséquent la neurogenèse adulte, peuvent être affectées (Pereira et al. 2014). Les cellules de la lignée oligodendrocytaire, notamment les précurseurs d'oligodendrocytes (PO), comptent également parmi les cellules du SNC les plus vulnérables à la chimiothérapie, en raison de leur programme de prolifération et de différenciation (Dietrich et al. 2006, Han et al. 2008, Bradl and Lassmann 2010).

En plus d'une toxicité directe associée aux mécanismes d'action des agents chimiothérapiques, les données cliniques suggèrent un rôle de l'inflammation dans les mécanismes, non seulement en entraînant des altérations de l'intégrité structurelle et/ou fonctionnelle de la BHE comme vu précédemment, mais également en provoquant un stress oxydant (phénomène également induit directement par la chimiothérapie), pouvant altérer voire conduire à l'apoptose cellulaire. Les dysfonctionnements mitochondriaux sont également suggérés comme intervenant dans la toxicité cellulaire induit par la chimiothérapie. Par exemple, il est connu que les taxanes entraînent des dommages structuraux au niveau des mitochondries, les rendant ainsi plus vulnérables aux agents chimiothérapiques (Kruidering et al. 1997, Cardoso et al. 2008). Il a d'ailleurs été suggéré que l'augmentation de la demande énergétique liée à ces dommages durant les tâches cognitives, qui ne peut alors pas être apportée par les mitochondries, contribuerait au moins en partie à la diminution des performances cognitives, ainsi qu'aux symptômes neurotoxiques (Lacourt and Heijnen 2017).

II.2.2.2.1 Cellules souches hippocampiques - Neurogenèse

L'hippocampe est connu pour son activité de neurogenèse, qui l'implique alors fortement dans les processus mnésiques (Pai and Jacobs 2004). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que cette structure joue un rôle crucial dans les processus spatiaux, l'apprentissage et la mémoire, qui sont sous-tendus par le processus de neurogenèse (Lemaire, Tronel et al. 2012), également crucial pour l'optimisation des fonctions cognitives (Deng et al. 2010). Des

études montrent que les neurones nouvellement formés par neurogenèse participent à l'acquisition et au rappel de la mémoire hippocampo-dépendante (Arruda-Carvalho et al. 2011), qui dépend aussi de la difficulté de la tâche mnésique : plus la tâche est complexe, plus le nombre de nouveaux neurones recrutés est important (Epp et al. 2010). La neurogenèse adulte est un processus long, divisé en deux étapes, qui consiste en la genèse de nouveaux neurones fonctionnels dans l'encéphale adulte : **(i) La prolifération** : correspond à la formation d'un nouveau neurone. Avant de devenir des neurones différenciés, les neurones en devenir sont des cellules souches neuronales. Afin d'assurer le maintien d'un *pool* de cellules souches, les cellules suivent une division asymétrique à l'issue de laquelle on retrouve une nouvelle cellule souche et une cellule progénitrice (précurseur). Les précurseurs se différencient ensuite en neuroblastes et devront suivre des étapes de maturation et d'intégration. **(ii) La maturation** : fait référence à la différenciation et à l'intégration dans les réseaux neuronaux fonctionnels existants. C'est à cette étape que les connexions dendritiques et axonales s'établissent.

Beaucoup d'études cliniques utilisant la neuro-imagerie confirment des effets aigus et à long terme de la chimiothérapie sur la fonction et la structure cérébrale, incluant une diminution du volume hippocampique et une altération des fonctions hippocampo-dépendantes. De plus, la plupart des agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique pour traiter divers cancers ont été testés chez l'animal. Globalement, la chimiothérapie entraîne une diminution des capacités cognitives, en particulier de la mémoire spatiale chez le rongeur, en lien avec une altération/diminution de la neurogenèse hippocampique adulte (Seigers et al. 2008, ElBeltagy, Mustafa et al. 2010, Briones and Woods 2011). Ensemble, ces résultats semblent confirmer que les agents chimiothérapeutiques peuvent altérer la structure et l'activité de l'hippocampe, de façon indirecte et/ou directe, ce qui sous-tendrait au moins en partie les troubles cognitifs observés.

✓ Données cliniques de neuro-imagerie : modifications structurales et fonctionnelles

Les investigations de neuroimagerie, notamment par l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), aide à clarifier les effets de la chimiothérapie sur la structure cérébrale. La plupart de ces investigations comparent en premier lieu le volume de l'hippocampe. Ensemble, les multiples études par IRM, malgré l'hétérogénéité existante à travers la littérature concernant l'étendue de la perte volumique, mettent en évidence une diminution du volume moyen de l'hippocampe chez les survivants du cancer faisant suite à la chimiothérapie, qui apparait corrélée aux déficits mnésiques (Inagaki et al. 2007, McDonald et al. 2010, Bergouignan et al. 2011, Genshaft et al. 2013, Kesler et al. 2013, Lepage et al. 2014). Ces dommages au niveau de l'hippocampe semblent se recouvrir partiellement de façon spontanée avec le temps selon quelques études, mais montre également des conséquences à long terme (McDonald, Conroy et al. 2010, Kesler, Janelins et al. 2013, Dietrich, Prust et al. 2015).

L'activité de l'hippocampe semble également être affectée par la chimiothérapie. Une étude réalisée en 2012 a montré que la chimiothérapie, chez l'Homme et chez le rat, entraînait une modification de l'activité hippocampique des ondes thêta, qui prédisent et favorisent un apprentissage efficace, en lien avec les déficits cognitifs mnésiques (Nokia et al. 2012). Quelques travaux par IRM fonctionnelle (IRMf) révèlent une hyperactivation de la région hippocampique après chimiothérapie lors de tâches mnésiques (Kesler et al. 2009, Lopez Zunini et al. 2013). Ces données suggèrent ici que les patients nécessitent un niveau de recrutement hippocampique plus important que le sujet sain pour une performance neurocognitive identique, probablement lié à un dysfonctionnement et à une diminution de l'efficacité de l'hippocampe. Par ailleurs et de façon inverse, la plupart des études relatent une hypoactivation de cette région, mais également du cortex préfrontal, pendant certaines tâches cognitives, corrélée avec les performances (de Ruiter, Reneman et al. 2011).

✓ Données précliniques sur les modèles animaux

Aux vues de ce qui est observé en clinique, les études comportementales sur l'animal ciblent notamment des tâches cognitives hippocampo-dépendantes. L'étude des substrats neurobiologiques, de ce fait, évalue particulièrement la toxicité hippocampique et la neurogenèse. Ce processus de neurogenèse est évalué par l'utilisation de marqueurs spécifiques endogènes du cycle cellulaire. Ces marqueurs comprennent des antigènes nucléaires, tels que le Ki67, qui est uniquement exprimé dans les cellules prolifératives, à tous les stades du cycle cellulaire (Scholzen and Gerdes 2000, Stoeber et al. 2001, Kee et al. 2002).

Plusieurs agents chimiothérapeutiques ont été utilisés pour évaluer le lien entre chimiothérapie, neurogenèse/toxicité hippocampique, et déficit cognitif chez le rongeur. Ainsi, les alkylants (sels de platine et cyclophosphamide), les anti-métabolites (5-FU et méthotrexate), les anthracyclines (doxorubicine) et les taxanes (docétaxel et paclitaxel), en administration seuls ou combinés, s'avèrent associés à une dégénérescence au niveau de l'hippocampe, et à des anomalies comportementales chez les rongeurs. Les études évaluant les effets du méthotrexate combiné à la 5-FU (Winocur et al. 2006, Foley et al. 2008, Winocur et al. 2012) chez la souris mettent en évidence la présence d'altérations de la mémoire spatiale, en plus d'une diminution des capacités d'apprentissage suite à la chimiothérapie. Le mélange cyclophosphamide/méthotrexate/5-FU (mélange CMF) (Briones and Woods 2011) chez le rat conduit également à des troubles de la mémoire et de l'apprentissage, en lien avec une diminution de la prolifération des cellules hippocampiques. De multiples études ont également évalué les effets toxiques du méthotrexate, du 5-FU et du cyclophosphamide en monothérapie. Chez le rat, le méthotrexate s'est révélé être nocif pour les performances de la mémoire spatiale et non spatiale, en corrélation avec une toxicité hippocampique visualisée par une diminution de la prolifération et de la survie cellulaire (Seigers et al. 2008, Lyons et al. 2011). Concernant le 5-FU, on observe une diminution des capacités de la mémoire de

travail (ElBeltagy et al. 2010), un trouble des fonctions exécutives reflété par une altération de la flexibilité et de la réaction à la nouveauté, mais pas d'impact sur la mémoire à long terme (Dubois et al. 2014). Ces déficits sont encore une fois liés à une diminution de la prolifération cellulaire hippocampique *in vivo* (ElBeltagy, Mustafa et al. 2010, Dubois, Lapinte et al. 2014). Des études *in vitro* montrent également une toxicité cellulaire induite par le 5-FU (Dubois, Lapinte et al. 2014). Les résultats sont plus variables concernant les effets du cyclophosphamide au niveau cérébral chez les rongeurs. Yang et ses collaborateurs en 2010 (Yang et al. 2010) démontrent que le cyclophosphamide induit des déficits cognitifs lors de tâche d'évitement passif et de reconnaissance de nouvel objet. Ces déficits sont en lien avec une diminution du nombre de cellules Ki67-doublecortine positives, marqueur de nouveaux neurones, qui se reverse spontanément entre 2 et 10 jours. A l'inverse, Lyons et ses collègues (Lyons, ElBeltagy et al. 2011) n'observent pas de déficit cognitif suite au cyclophosphamide, bien que la chimiothérapie entraîne tout de même une diminution de la survie cellulaire hippocampique sans affecter la prolifération. Ces résultats semblent indiquer que le cyclophosphamide entraîne une toxicité accrue des nouveaux neurones hippocampiques. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que le cyclophosphamide semble être moins toxique que les autres agents avec lesquels il est couramment combiné en clinique (Lyons, ElBeltagy et al. 2011). Les alkylants sels de platine ont également été évalués sur des modèles précliniques rongeurs. Globalement, on observe une diminution des performances cognitives avec une diminution du nombre de cellules doublecortine positives dans l'hippocampe suite à l'administration de cisplatine (Chiu et al. 2017) et d'oxaliplatine (Fardell et al. 2012), bien que l'oxaliplatine semble moins toxique seul qu'en combinaison à la 5-FU concernant des tâches hippocampo-dépendantes (Fardell, Vardy et al. 2012). Ces résultats suggèrent que la combinaison d'agents cytotoxiques peut être un facteur aggravant de l'apparition et/ou de la sévérité du syndrome *chemobrain*. Peu d'études ont porté sur l'évaluation des effets des

anthracyclines. Cependant, Christie et ses collègues ont montré que la doxorubicine induit un déclin cognitif associé à une diminution de la neurogenèse hippocampique adulte chez le rat (Christie et al. 2012). Enfin, concernant les taxanes, le paclitaxel se révèle être toxique pour la neurogenèse, et induit également des déficits mnésiques (Huehnchen et al. 2017). Plusieurs résultats révèlent également chez la souris et le rat que le docétaxel conduit à des déficits de la mémoire spatiale et non spatiale (Fardell et al. 2013, Fardell et al. 2014, Callaghan and O'Mara 2015, Seigers et al. 2015, Seigers et al. 2016), avec également une atteinte des fonctions exécutives, et en particulier de l'attention (Seigers, Loos et al. 2015, Seigers, Loos et al. 2016). Malheureusement, seule une étude répertoriée ici a évalué la toxicité hippocampique, révélant aucun effet concernant les cellules Ki67 ou doublecortine positives (Seigers, Loos et al. 2016).

II.2.2.2.2 Cellules progénitrices des oligodendrocytes et pathologie de la substance blanche

Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC. Ils sont le produit final d'une lignée cellulaire qui doit subir un programme de prolifération, de migration et de différenciation pour finalement produire la gaine de myéline des axones, formant la substance blanche (SB). Les oligodendrocytes dérivent de cellules précurseurs d'oligodendrocytes (PO), distinguées des autres cellules gliales notamment par leur expression du sulfate de chondroïtine protéoglycane NG2, et connues comme prolifératives à l'âge adulte (Dawson et al. 2003). Ces cellules PO subissent une division d'auto-renouvellement et se différencient en oligodendrocytes myélinisants (Dimou et al. 2008, Robins et al. 2013). Les cellules dérivées des PO peuvent donc servir à la myélinisation des axones non myélinisés, au remodelage de la myéline existante, et à la réparation après démyélinisation (Robins and Kokoeva 2018).

Des études cliniques utilisant la neuro-imagerie démontrent des changements de la SB qui sont courants, et qui semblent se stabiliser dans le temps (Deprez et al. 2012). Certains auteurs

ont émis l'hypothèse que l'incidence de la modification de la SB liée à la chimiothérapie à forte dose dépasse probablement les 50 %, et pourrait survenir entre un et trois mois après le début de la chimiothérapie (Deprez, Amant et al. 2012). Les études précliniques quant à elles ont permis de mettre en évidence une relation potentielle entre les lésions des cellules progénitrices, le maintien de l'intégrité de la SB et les troubles cognitifs (Dietrich, Han et al. 2006, Dietrich et al. 2008, Han, Yang et al. 2008).

✓ Données cliniques en neuro-imagerie

Différentes études utilisant l'IRM ont évalué les changements structuraux de la SB au niveau du SNC chez des patients ayant suivi un traitement chimiothérapique. Ces études révèlent que la doxorubicine, l'épirubicine, le cyclophosphamide, le méthotrexate, le 5-FU ou encore le paclitaxel sont associés à une diminution du volume et de l'intégrité de la SB, en particulier au niveau du cortex préfrontal, de la région hippocampique et parahippocampique, du cortex cingulaire et du corps calleux (Linnebank et al. 2005, Reddick et al. 2006, Abraham et al. 2008, Matsos et al. 2017). Ces modifications de la SB sont corrélées à une diminution de l'attention, de la concentration, de la vitesse de traitement et de la mémoire chez les patients (Correa et al. 2004, Reddick, Shan et al. 2006, Inagaki, Yoshikawa et al. 2007), et peuvent être encore observables plusieurs mois (Correa, DeAngelis et al. 2004, Deprez, Amant et al. 2012), voire même années (Abraham, Haut et al. 2008, Matsos, Loomes et al. 2017), après la fin du traitement chimiothérapique. Une étude utilisant la méthode d'imagerie par tension de diffusion (*Diffusion Tensor Images* ou DTI) montre une diminution de l'anisotropie dans le genou du corps calleux, ainsi qu'au niveau du cortex frontal et temporal (Schagen and Wefel 2013), pouvant être relatée par une démyélinisation de la SB des axones ou d'éventuels dommages axonaux après la chimiothérapie.

✓ Données précliniques

Globalement on retrouve chez le rongeur des dommages des oligodendrocytes post-mitotiques matures et des populations immatures progénitrices PO suite à l'administration de chimiothérapie. Le cyclophosphamide, le méthotrexate, le 5-FU, la doxorubicine, le cisplatine ou encore le paclitaxel entraînent une diminution de la mémoire en lien avec des changements de la myélinisation, en particulier au niveau du corps calleux, et une diminution du nombre de PO et de l'expression de marqueurs de l'intégrité des oligodendrocytes tels que la protéine basique de la myéline (*myelin basic protein* ou MBP) ou le facteur de transcription oligodendrocytaire Olig2 (Gregorios et al. 1989, Dietrich, Han et al. 2006, Han, Yang et al. 2008, Briones and Woods 2014, Chiu, Maj et al. 2017). Des études *in vitro* montrent également que le cisplatine est létale pour les PO en culture, et que le 5-FU diminue leur division et favorise leur mort cellulaire (Dietrich, Han et al. 2006). Ensemble, les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la chimiothérapie diminue le nombre de cellules PO, et diminue leur habileté à se diviser et se différencier en cellules matures (Briones and Woods 2014).

Les études cliniques de neuro-imagerie et les recherches précliniques après traitement chimiothérapique suggèrent une pathologie de la SB, où la SB commissurale semble plus affectée que les fibres de projections (Matsos, Loomes et al. 2017). La relation entre SB et cognition est bien établie ; la vitesse de traitement, le temps de réaction, la mémoire (rappel mnésique, mémoire épisodique et de travail) ainsi que les fonctions exécutives sont des processus associés à la densité de fibres, au diamètre axonal mais également à l'état de myélinisation (Matsos, Loomes et al. 2017). La chimiothérapie, à travers cette toxicité de la SB, peut altérer les processus de réparation, le réapprovisionnement cellulaire et la conduction nerveuse (Dietrich, Han et al. 2006, Han, Yang et al. 2008), participant ainsi au déclin cognitif.

III/ Troubles neurologiques induits par la chimiothérapie néoadjuvante (CNA) du cancer du sein

Les cancers du sein se situent au premier rang des cancers incidents chez la femme, nettement devant le cancer colorectal et le cancer du poumon. C'est également la première cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde, avec 18,2 % des décès féminins par cancer. Il représente par ailleurs près de 8 % de l'ensemble des décès par cancer tous sexes confondus (Ferlay et al. 2013). Cependant, on observe une augmentation du nombre de survivants d'un cancer du sein, où la survie relative dans les 5 ans est supérieure à 80 % dans la plupart des pays développés (De Angelis et al. 2014). Ceci peut être interprété comme le résultat des améliorations du diagnostic précoce, ainsi que des avancées dans les traitements anticancéreux. Parmi les traitements des cancers du sein, la chimiothérapie pré-opérative dite néoadjuvante (CNA), dont les protocoles modernes font appels aux anthracyclines et aux taxanes, est entrée en routine thérapeutique du fait de ses apports bénéfiques spécifiques pour les patientes par rapport à la chimiothérapie adjuvante. La CNA répond à plusieurs objectifs, dominés par l'obtention d'une conservation mammaire. Malheureusement, la CNA est également associée à une neurotoxicité du SNP et du SNC entraînant des troubles neurologiques partageant les caractéristiques communes aux troubles chimio-induits traités dans le chapitre précédent.

Dans le but de bien comprendre l'importance de la CNA dans le traitement du cancer du sein et ses conséquences physiopathologiques, ce chapitre complémentaire aborde plus en détail les spécificités de la CNA : son principe, ses objectifs, les CNA standards utilisées et l'incidence plus spécifique des troubles neurologiques qui lui sont associés.

III.1. La chimiothérapie néoadjuvante du cancer du sein

III.1.1. Principe et objectifs de la CNA

La CNA, également dénommée thérapie d'induction ou pré-opérative, est un traitement systémique par des agents antinéoplasiques qui, à la différence de la thérapie dite adjuvante, est administrée en première intention, c'est-à-dire avant le traitement principal locorégional qui est le plus souvent la chirurgie et/ou la radiothérapie (Masood 2016). La CNA, tout comme la chimiothérapie adjuvante, permet de traiter la maladie métastatique en limitant les risques de récidives, mais son apport spécifique est d'offrir une diminution du volume tumoral. En induisant une nette régression du volume tumoral, la CNA rend possible non seulement la chirurgie dans les cas de cancers avancés qui sont non opérables d'emblés, mais améliore également la résection chirurgicale conservatrice, en évitant la mastectomie (Masood 2016). Historiquement initiée dans les années 70 pour le traitement des tumeurs localement avancées afin d'améliorer la survie en comparaison à un traitement local exclusif, face aux résultats encourageants obtenus la CNA s'est progressivement imposée comme pilier de l'approche thérapeutique des sujets avec cancer du sein de tous stades, y compris pour les tumeurs opérables d'emblée (Masood 2016). La CNA offre également d'autres bénéfices, notamment l'opportunité d'évaluer la réponse au traitement par la réponse pathologique complète qui est un marqueur de survie. Elle permet également l'évaluation plus rapide de l'efficacité de nouveaux agents thérapeutiques, et donc l'arrêt de façon précoce des traitements inefficaces (Masood 2016). En outre, la CNA permet d'étudier directement la sensibilité de la tumeur aux traitements, et d'identifier celles dont la réponse complète serait associée à un bon pronostic ainsi que celles dont la réponse partielle serait associée à une résistance, et donc à un pronostic moins favorable.

La CNA permet donc aux patientes qui en bénéficient d'obtenir une meilleure éradication, et de surcroît plus précoce, de la maladie métastatique. En permettant de tester la

chimio-sensibilité tumorale, la CNA offre également la possibilité d'une adaptation individuelle à la chimiothérapie. En rendant possible la chirurgie et/ou en offrant la possibilité de la rendre conservatrice, la CNA améliore alors la préservation de l'intégrité physique et psychologique des patientes, pour lesquelles la perte d'un sein a un impact sur le plan physique mais également psychologique, en modifiant souvent l'image de soi.

III.1.2. Bénéfices et réponse classique suite à la CNA

Depuis l'introduction de ce concept, on observe une augmentation significative du taux de thérapie conservatrice et de conservation mammaire. La CNA entraîne une réduction nette du volume tumoral des cancers du sein de plus de 50% dans plus de 60% des cas, ce qui permet d'éviter la mastectomie chez environ 25 à 50 % des patientes selon les études, même si pour certaines patientes (moins de 5%) originellement candidates pour une chirurgie conservatrice subissent une mastectomie à cause de la progression de la maladie (Spanheimer et al. 2013, Masood 2016). Dans les différentes études, globalement après CNA, les réponses cliniques complètes sont observées dans 20 à 50% des cas, autorisant une conservation mammaire de 60 à 80% et une survie à cinq ans aux alentours de 50-70% (Masood 2016). La chimiothérapie d'induction semble donc répondre à son premier objectif en augmentant significativement l'accès à la chirurgie aux stades avancés et la fréquence de conservation mammaire. Par contre, aucune amélioration significative de la survie par rapport à la thérapie adjuvante n'a été démontrée, mais il semble acquis que la chimiothérapie d'induction ne soit pas délétère sur la survie.

III.1.3. Traitements standards utilisés : thérapies séquentielles anthracyclines et taxanes

Aucun régime de chimiothérapie standard n'a été identifié pour traiter le cancer du sein. Les chimiothérapies à base d'anthracyclines et de taxanes ont largement été étudiées dans des essais cliniques (Kaufmann et al. 2006, Van de Wiel et al. 2017) donnant lieu à un

accord sur leur utilisation comme premier choix de traitement. Ainsi, ce sont les traitements les plus fréquemment prescrits chez les patientes (Kaufmann, von Minckwitz et al. 2003, Hainsworth et al. 2006, Lombardi, Scalone et al. 2010). Dans les années 90, la CNA basée sur l'utilisation d'anthracyclines seules est fréquente (Therasse et al. 2003). Cependant, plusieurs années plus tard, des études ont notifié que l'adjonction de taxane, en particulier du docétaxel, permettait d'augmenter le taux de réponse clinique et de réponse histologique complète par rapport à l'utilisation d'anthracycline seule (Goble and Bear 2003).

Il est à noter que la séquence d'administration des agents cytotoxiques semble être un élément non négligeable pour la réussite et la sûreté du traitement. En effet, plusieurs essais cliniques montrent que l'administration séquentielle d'anthracycline suivie de taxane, qui est plus bénéfique que l'administration concomitante (von Minckwitz et al. 2005, Shao et al. 2012), entraîne également moins d'effets secondaires (Eiermann et al. 2011).

Concernant le choix des molécules appartenant à la famille des anthracyclines et des taxanes, différents essais cliniques de phase I/II, II, III ainsi que des études rétrospectives ont montré des résultats prometteurs et encourageants quant à l'utilisation de l'épirubicine (EPI-anthracycline) suivie du docétaxel (DO-taxane), qui ont l'avantage d'avoir moins d'effets secondaires que leur analogue respectif, la doxorubicine et le paclitaxel (Fabi, Papaldo et al. 2004, Hainsworth, Yardley et al. 2006, Lombardi, Scalone et al. 2010, Eckhoff et al. 2011, Schonherr et al. 2012, Trudeau et al. 2015). De plus, il est connu qu'il n'existe pas d'interaction pharmacocinétique entre EPI et DO (Pagani et al. 1999). C'est pour ces raisons qu'en France, pour traiter les cancers du sein, l'association la plus fréquemment utilisée par les cliniciens oncologues fait appel à plusieurs cures d'EPI suivies de plusieurs cures de DO, appelée CNA TaxotèreTM séquentielle.

III.1.4. Toxicité et effets secondaires

Malheureusement, la CNA induit des effets secondaires délétères pour les patientes, conséquences de sa toxicité sur les cellules saines. La plupart de ces effets secondaires sont communs à toutes les drogues, mais présentent des degrés de sévérité variables selon le type de chimiothérapeutique utilisé, de la dose cumulée, de la fréquence d'administration et de la susceptibilité individuelle.

De façon courante, la chimiothérapie entraîne des troubles digestifs caractérisés par des nausées, des vomissements, des diarrhées/constipations ou encore des modifications du goût. La toxicité hématologique liée à l'effet myélosuppresseur des antinéoplasiques entraîne fréquemment des modifications de la numération de la formule sanguine. On retrouve ainsi chez les patientes des altérations de la production par la moelle osseuse des globules blancs (neutropénie), des globules rouges (anémie), et des plaquettes (thrombopénie). Les patientes peuvent également souffrir de troubles de la peau (sécheresse par exemple), des muqueuses (mucites), des cheveux (alopécie) et/ou des ongles (Fabi, Papaldo et al. 2004, Walker, Eremin et al. 2011). Les patientes rapportent également une grande fatigue (asthénie) surtout fréquente dans les jours qui suivent l'administration de la chimiothérapie. Cette fatigue peut avoir des causes variées et parfois intriquées. Elle peut être le biais d'autres effets indésirables induits comme l'anémie, la déshydratation en rapport avec une diarrhée et/ou des vomissements, ou être liée directement à la chimiothérapie. Certaines classes de chimiothérapie entraînent également une toxicité spécifique. L'utilisation d'anthracyclines est notamment souvent associée à une forte toxicité myocardique conduisant à une insuffisance cardiaque (Dong and Chen 2018, Yu et al. 2018).

Nous avons vu précédemment que, parmi les effets secondaires de la chimiothérapie, les patientes présentent fréquemment des troubles du système nerveux. Ces troubles neurologiques représentent les effets secondaires non-hématologiques les plus sévères et les

plus handicapants, et constituent un frein au traitement antitumoral. On retrouve notamment des altérations du SNP, sans épargner le SNC.

III.2. Troubles neurologiques induits par la CNA

D'un point de vue sémiologique et physiopathologique, les troubles neurologiques CNA-induits partagent des points communs avec les troubles neurologiques causés par d'autres agents chimiothérapeutiques. Globalement, la CNA provoque l'apparition d'une neuropathie périphérique à prédominance sensitive, et des troubles cognitifs regroupés sous le terme du syndrome du *chemobrain*.

Ainsi, plusieurs études révèlent que les complications neurologiques secondaires au traitement CNA du cancer du sein sont fréquentes, et sont un facteur important de morbidité chez les patientes. La quantification de l'incidence des complications neurologiques dans le traitement du cancer du sein durant la première année après le diagnostic montre que 48% des patientes présentent des complications neurologiques (Pereira, Fontes et al. 2014). Parmi les troubles neurologiques induits par la CNA du cancer du sein utilisant l'EPI suivi du DO, 20 à 55% des patientes développent une NPCI à la fin ou durant la première année de traitement chimiothérapique (Kaya et al. 2010, Pereira, Fontes et al. 2014, Pereira et al. 2015, Lee et al. 2018). Pour près de 20% des patientes, ces troubles neurologiques du SNP se développent sous une forme chronique et deviennent persistants (Lee, Jung et al. 2018). Les neuropathies motrices associées à la CNA sont moins fréquentes que les neuropathies sensorielles : pour plus de 30% des patientes la NPCI est douloureuse, alors que les troubles moteurs apparaissent dans 7 à 20% des cas (Pereira, Fontes et al. 2015). Enfin, plusieurs études révèlent l'apparition de déficits cognitifs sous la forme de troubles mnésiques, attentionnels et des fonctions exécutives pour 10 à 30% des patientes (Hermelink et al. 2007, Pereira, Fontes et al. 2015).

Ces dysfonctionnements fréquents retentissent sur la qualité de vie des patientes, sur leur capacité à travailler ou à effectuer des activités normales de la vie quotidienne, et affectent leur niveau de confiance. De plus, l'apparition et/ou la sévérité de ces troubles neurologiques peut également contraindre à modifier voire arrêter le traitement anti-tumoral. Ceci a pour conséquences, en plus d'affecter la survie globale, d'empêcher les patientes de bénéficier du protocole de chimiothérapie optimal permettant une chirurgie conservatrice, les privant ainsi des bénéfices de la CNA. La prise en charge de ces troubles neurologiques est donc d'une importance primordiale.

IV/ Prise en charge thérapeutique et inefficacité des traitements actuels contre les troubles neurologiques chimio-induits

Dans le chapitre II, nous avons abordé la complexité et le caractère multifactoriel des mécanismes liés aux troubles neurologiques chimio-induits. Le caractère complexe de la physiopathologie sous-jacente aux troubles neurologiques chimio-induits rend difficile et problématique leur diagnostic, leur compréhension, et de ce fait leur prise en charge. Le développement d'interventions fiables et efficaces pour lutter contre le syndrome du *chemobrain* a également été retardé par les difficultés dans la conceptualisation et dans l'évaluation de ce syndrome (Ahles 2012).

L'un des défis actuels concerne la prise en charge et la prévention de ces troubles neurologiques secondaires à la chimiothérapie. En effet, à l'heure actuelle les thérapeutiques proposées sont non spécifiques et controversées, et visent en premier lieu à améliorer la qualité de vie des patientes en traitant leurs symptômes.

IV.1. Présentation des traitements actuels et de leur inefficacité

IV.1.1 Prise en charge des neuropathies périphériques chimio-induites

Compte tenu du caractère prédominant sensoriel des NPCI, les médications actuelles visent à traiter la douleur neuropathique, définie par l'association internationale pour l'étude de la douleur (*International association for the study of pain* - IASP) comme étant une douleur liée à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel. Afin de faciliter le traitement de la douleur neuropathique, des guides de pratique clinique ont été publiés par un certain nombre d'associations professionnelles internationales et régionales, telles que l'IASP, la fédération Européenne des sociétés neurologiques (*the European*

Federation of Neurological Societies ou EFNS), l'Institut national d'excellence en santé et soins (*the National Institute for Health and Care Excellence* ou NICE) et la société canadienne de la douleur (*the Canadian Pain Society* ou CPS) (Cruccu and Truini 2017).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitements spécifiques et curatifs des NPCI. Cependant, des traitements symptomatologiques ayant donné une certaine efficacité dans d'autres pathologies sont utilisés. Il existe un large consensus parmi les lignes directrices sur le traitement pharmacologique de la douleur neuropathique (Deng et al. 2016), récapitulé dans le tableau 9. Ainsi, trois classes de médicaments ont reçu une forte recommandation pour le traitement de première ligne dans toutes les lignes directrices de conduite : les antidépresseurs tricycliques (TCA-Amitriptyline, Nortriptyline), les antidépresseurs inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (Duloxetine, Venlafaxine) et les antiépileptiques ligands du canal alpha-2-delta calcique (Gabapentine, Pregabaline). Il est à noter que les agents tricycliques sont moins tolérés et présentent plus de contre-indications que les inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, notamment chez les personnes âgées (Watson et al. 1998, Cruccu and Truini 2017). En deuxième ligne, les praticiens peuvent avoir recours à l'utilisation d'analgésiques opioïdes (Tapentadol, Tramadol) pour lutter contre la douleur. Enfin, en 3^{ème} et 4^{ème} lignes, d'autres analgésiques opioïdes forts, des agents antiépileptiques autres que les gabapentinoïdes (Lamotrigine), ou des cannabinoïdes sont recommandés par la plupart des guidelines (Pachman et al. 2014, Kim et al. 2015, Cruccu and Truini 2017, Fornasari 2017).

Tableau 9 : Recommandations dans le traitement des douleurs neuropathiques (Modifié de Cruccu et Truini, 2017)

	Neuropathie diabétique	Névralgie trigéminal	Neuropathie post-herpétique	Toutes les douleurs neuropathiques
1^{ère} ligne	Duloxétine Gabapentine Pregabaline TCA Venlafaxine	Carbamazepine Oxcarbazepine	Gabapentine Pregabaline TCA Patch Lidocaïne	Amitriptyline Duloxétine Gabapentine Crème Prégabaline
2^{ème} ligne	Tramadol		Opioïdes forts Crème Capsaïcine	L'un des trois médicaments oraux restant de la 1 ^{ère} ligne Tramadol Opioïdes forts Crème ou patch Lidocaïne
3^{ème} et 4^{ème} ligne	Opioïdes forts			L'un des trois médicaments oraux restant de la 1 ^{ère} ligne Opioïdes forts Cannabinoïdes Lamotrigine Lacosamide Toxine Botulique Crème ou patch de Lidocaïne

TCA : Antidépresseur tricyclique

Certains de ces agents ont été étudiés dans des essais contrôlés randomisés pour le traitement des NPCI (récapitulés dans le tableau 10), dont le succès était limité. Les essais cliniques des agents antiépileptiques gabapentine (Rao et al. 2007) et lamotrigine (Rao et al. 2008) et les antidépresseurs nortriptyline (Hammack et al. 2002) et l'amitriptyline (Kautio et al. 2008) ont tous été négatifs. Dans l'étude EFFOX, Durand et ses collaborateurs (Durand et al. 2012) ont évalué l'efficacité de la venlafaxine (antidépresseur inhibiteur de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline) contre la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine. Dans cet essai portant sur 48 patients et contrôlé par l'utilisation de placebo, la venlafaxine peut fournir un soulagement dans la récurrence de la neurotoxicité aiguë. Un mélange topique de baclofène (agoniste du récepteur GABA-B), d'amitriptyline et de kétamine, ou appelé mélange BAK, a été étudié par Barton et ses collègues (Barton et al. 2011) pour traiter la NPCI chez des patients. Les auteurs ont supposé, du fait des nombreuses voies complexes dont résulte la NPCI, qu'une combinaison de médicaments avec des mécanismes d'action uniques mais complémentaires peut être bénéfique pour sa prise en charge. Par rapport à l'utilisation de placebo, ce traitement local entraîne une diminution des troubles liés à la neuropathie motrice et une tendance à l'amélioration concernant la neuropathie sensorielle. Cependant, l'effet global reste mitigé et modeste. Un autre groupe a évalué l'utilisation d'un mélange d'amitriptyline et de kétamine, ou dit mélange AK, en application locale, et n'a trouvé aucune réduction significative des symptômes neuropathiques (Gewandter et al. 2014). Seule véritablement la duloxétine (DU), inhibiteur de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline recommandée dans le traitement de la neuropathie diabétique, s'est révélée plus ou moins efficace dans le traitement de la NPCI. Un essai clinique de phase 3, randomisé et en double aveugle, contrôlé par l'utilisation de placebo a évalué l'utilisation de la DU dans le traitement des NPCI douloureuses (Smith, Pang et al. 2013). Les auteurs ont constaté que

l'utilisation de la DU entraîne une réduction de la douleur pour 59% des patients dans cette étude.

Tableau 10 : Caractéristiques et résultats des essais contrôlés randomisés pour le traitement des NPCI

Agent étudié et dose	Nb patients et design	Drogue causant NPCI	Résultats	Résultats généraux	Effets secondaires	Références
Amitriptyline 10mg/j avec augmentation 10mg/sem Max 50mg/j pdt 8 semaines	Total 33 Placebo 16 Amitriptyline 17 Double aveugle	Alcaloïdes Sels platine Taxanes	Globale amélioration non significative	Négatif	Fatigue Tachychardie	Kautio et al., 2008
Nortriptyline 25mg/j avec augmentation 25mg/sem Max 100mg	Total 51 Double aveugle Etude croisée après 4sem	Cisplatine	Pas de diminution des parésthésies	Négatif	Bouche sèche Vertiges Constipation	Hammack et al., 2002
Venlafaxine 50mg 1h avant la chimiothérapie puis 37,5mg 2 fois/j	Total 48 Placebo 24 Venlafaxine 24 Double aveugle	Oxaliplatine	Soulagement de la neurotoxicité aigue	Positif	Nausée, vomissements Asthénie Somnolence	Durand et al., 2012
Duloxétine 30mg/j 1sem puis 60mg/j 4sem	Total 231 Double aveugle Etude croisée après 5 sem	Sels platine Taxanes	Diminution de la douleur	Positif	Fatigue (7%) Insomnie (5%) Nausée (5%)	Smith et al., 2013
Gabapentine 300mg avec augmentation de 300mg Max 2700mg/j-6sem	Total 115 Double aveugle Etude croisée 6sem	Sels platine Taxanes Alcaloïdes	Douleurs « moyennes »	Négatif	Pas de différence significative dans la toxicité entre les groupes	Rao et al., 2007

(Suite Tableau 10)

Agent étudié et dose	Nb patients et design	Drogue causant NPCI	Résultats	Résultats généraux	Effets secondaires	Références
Lamotrigine 25, 50, 100 ou 150mg 2fois/j pendant 2sem	Total 125 Placebo 62 Lamotrigine 63 Double aveugle	Sels platine Taxanes Alcaloïdes	Douleurs « moyennes », pas de différence significative entre les groupes	Négatif	Pas de différence significative dans la toxicité entre les groupes	Rao et al., 2008
BAK en gel 1.31g de gel contenant 10mg Baclofène, 40mg Amitriptyline et 20mg Kétamine 2 fois/j pendant 4sem	Total 203 Placebo 102 BAK 101 Double aveugle	Sels platine Taxanes Alcaloïdes Thalidomide	Pas d'amélioration significative de la neuropathie sensorielle Amélioration de la neuropathie motrice	Négatif-Modeste	Pas de différence significative dans la toxicité entre les groupes	Barton et al., 2011
AK en crème 4g 2 fois/j pendant 6sem	Total 458 Placebo 231 AK 227	Taxanes	Pas de réduction de la douleur et des paresthésies	Négatif	Pas de différence significative dans la toxicité entre les groupes	Gewandter et al., 2014

[Selon et modifié de (Bakogeorgos and Georgoulis 2017)]

AK : Amitriptyline ; BAK : Baclofène-Amitriptyline-Kétamine

Concernant la prévention ou la limitation de l'incidence et de la sévérité de la NPCI, malgré plusieurs efforts et études, aucun traitement efficace n'existe, et aucun agent établi n'est recommandé (Bakogeorgos and Georgoulis 2017). Les récentes guidelines publiées par l'association américaine d'oncologie clinique (*American Society of Clinical Oncology – ASCO*) sur la prévention des NPCI, basées sur une revue systématique de 42 essais cliniques randomisés portant sur 18 agents, constatent qu'il n'existe pas d'agent qui montrent des bénéfices cliniques concluants pour la prévention des NPCI (Hershman et al. 2014, Bakogeorgos and Georgoulis 2017). De plus, aux Etats-Unis, l'Institut National pour le cancer (*The national cancer institute - NCI*) a sponsorisé 15 essais cliniques pour étudier la prévention de la NPCI. Parmi ces études, encore une fois seule la DU a été montrée comme une aide, mais toujours mitigée, pour lutter contre l'apparition des douleurs neuropathiques de la NPCI (Staff et al. 2017).

Tous ces composés précités, en plus de présenter des effets secondaires et des phénomènes de tolérance et d'addiction, montrent une efficacité mitigée voir absente pour lutter contre les NPCI et pour prévenir leur apparition et/ou leur sévérité (Pachman, Watson et al. 2014, Kim, Dougherty et al. 2015, Cruccu and Truini 2017), même s'ils sont largement utilisés dans le traitement d'autre type de neuropathies périphériques comme celle induite par le diabète (Al-Atiyyat and Obaid 2017). Les traitements actuellement disponibles restent donc encore limités. D'après tous ces résultats, les lignes directrices des bonnes pratiques cliniques donnent une recommandation, bien que modérée, pour l'utilisation de la DU chez les patients cancéreux souffrant de douleurs neuropathiques chimio-induites (Trivedi et al., 2015).

IV.1.2 Prise en charge des troubles cognitifs induits par la chimiothérapie

Les troubles cognitifs chimio-induits retentissent de façon significative sur la qualité de vie des patients. La prise en charge de ces troubles, qu'elle soit médicamenteuse ou basée sur des thérapies cognitivo-comportementales, vise ainsi en premier lieu à améliorer les performances cognitives qui sont altérées dans le cadre du syndrome du *chemobrain*, afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Malheureusement, les solutions thérapeutiques actuellement mises en œuvre montrent des effets bénéfiques mitigés sans réelles preuves d'efficacité, même s'ils ont l'air encourageants (Kohli, Fisher et al. 2009, McNeil 2012).

IV.1.2.1 Prise en charge médicamenteuse

Les options de **traitements pharmacologiques** pour les déficits cognitifs chez les survivants du cancer sont empruntées à diverses maladies, y compris le trouble déficitaire de l'attention/hyperactivité et les maladies neurodégénératives (Kohli, Fisher et al. 2009). Bien que peu d'études évaluent leur efficacité dans le traitement des troubles cognitifs chimio-induits, et que celles-ci sont controversées sans démontrer une réelle preuve d'efficacité, la prise en charge médicamenteuse actuelle comporte l'utilisation de modafinil, de méthylphénidate ou de donépézil.

- **Le modafinil**

Le modafinil est un psychostimulant non-amphétamine efficace et bien toléré dans le traitement de la narcolepsie, et chez les personnes atteintes de troubles du sommeil (Kohli, Fisher et al. 2009). Bien que le mécanisme précis par lequel le modafinil favorise l'éveil soit inconnu, il exerce des actions comme celles des agents sympathomimétiques, y compris l'amphétamine et le méthylphénidate. Les études indiquent des résultats variables et non concluants du modafinil pour soulager les problèmes d'attention et de mémoire associés à la

chimiothérapie des patientes survivantes d'un cancer du sein (Jean-Pierre et al. 2010, Davis et al. 2013).

- **Le méthylphénidate**

Le méthylphénidate est également un psychostimulant sympathicomimétique qui augmente la sécrétion de catécholamines (dopamine et noradrénaline) par le SNC (Elovic 2000, Napolitano et al. 2005). Il est habituellement utilisé dans le traitement symptomatique du trouble de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité, et secondairement pour traiter la narcolepsie ou l'hypersomnie. Sa capacité à préserver les fonctions cognitives pendant la chimiothérapie a été évaluée, révélant que chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, aucun avantage significatif sur les fonctions cognitives n'a été observé avec le méthylphénidate par rapport au placebo (Mar Fan et al. 2008).

- **Le donépézil**

Le donépézil est un inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase, connu pour améliorer la cognition chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou ayant subi un accident vasculaire cérébral traumatique, ou encore chez les sujets âgés (Yesavage et al. 2002, Berthier et al. 2003, Zhang et al. 2004, Black et al. 2007). Cependant, aucune étude clinique n'évalue ses effets bénéfiques potentiels sur les performances cognitives des patientes ayant suivi un traitement chimiothérapique.

IV.1.2.2 Thérapies cognitivo-comportementales

Des approches de réhabilitation ou de **remédiation cognitive** sont également développées, où des thérapies cognitivo-comportementales sont proposées aux patients, dont le but est d'apprendre la mise en place de stratégies de compensation. Les interventions comportementales pourraient aider les patientes à trouver des moyens de contrôler leurs problèmes d'attention, de mémoire, et d'autres aspects des fonctions cognitives. Ce type

d'intervention comprend des exercices mentaux et d'entraînement cognitif basés sur la plasticité cérébrale (approches compensatoires) et l'utilisation de technologies pour assister et aider le rappel mnésique, l'aide à la concentration et à l'attention.

Pour réduire le dysfonctionnement cognitif associé à la chimiothérapie, des ateliers de psychoéducation et de stimulation cognitive réalisés en petits groupes chez des patientes ayant été traitées pour un cancer du sein ont été mis en place. Ces études préliminaires ont suggéré cette thérapie comme étant prometteuse dans l'amélioration des capacités cognitives et de la qualité de vie des patientes (Ferguson et al. 2007, Ferguson et al. 2012, Alvarez et al. 2013). L'entraînement cognitif informatisé a également été suggéré comme potentiellement bénéfique, avec des mesures améliorées de la mémoire de travail et des fonctions exécutives (Kesler et al. 2013). Tout comme pour les prises en charge médicamenteuse, bien que les remédiations cognitives présentent des résultats encourageants, de futures recherches et essais sont nécessaires pour établir si ces thérapies sont véritablement efficaces comme traitement des déficits cognitifs associés à la chimiothérapie du cancer du sein chez les femmes.

V/ Développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre les troubles neurologiques chimio-induits

Pour élaborer et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'utilisation de modèles expérimentaux animaux s'avère utile et indispensable. Les modèles animaux mimant les troubles neurologiques chimio-induits chez les patientes, non seulement permettent l'évaluation de stratégies thérapeutiques, mais facilitent également l'étude des mécanismes sous-jacents aux troubles neurologiques. Les modèles animaux actuellement disponibles seront abordés de façon non exhaustive dans ce chapitre. Du fait de l'impact et des conséquences pour les patientes causés par les troubles neurologiques CNA-induits, et de l'absence de thérapeutique spécifique et efficace, trouver un traitement devient primordial et fait parti des défis actuels en santé. Et pourtant, aucun modèle préclinique de troubles neurologiques induits par la CNA-[EPI-DO], actuellement standard en clinique humaine dans la prise en charge pré-opérative des cancers du sein, n'a été établi. Des efforts indispensables restent alors à faire pour disposer de nouveaux modèles/outils pertinents, pouvant faciliter le développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre les troubles neurologiques CNA-induits.

Parmi les stratégies thérapeutiques potentiels, la duloxétine (DU), qui sera présentée dans un second temps dans ce chapitre, est actuellement utilisée et recommandée par les différentes lignes directives pour la prise en charge des NPCI compte tenu de ses effets analgésiques et neuroprotecteurs. Par action pro-cognitive et neuroprotectrice, la DU exerce également des effets bénéfiques sur le SNC, ce qui pourrait alors lui suggérer un rôle positif, pour le moment jamais évalué, dans la prise en charge du syndrome du *chemobrain*. Cependant, bien qu'utilisée en clinique contre les NPCI, la DU présente des effets bénéfiques modestes et partiels, accompagnés d'événements secondaires indésirables importants,

notamment à forte dose, conduisant à l'arrêt de la prise de la DU pour un patient sur quatre environ. Il reste alors un effort à faire pour optimiser les effets bénéfiques de la DU, tout en réduisant ses effets secondaires.

V.1. Modèles animaux disponibles pour la recherche préclinique : nécessité de caractériser un modèle animal de troubles neurologiques CNA-induits

La plupart des agents chimiothérapeutiques à l'origine de troubles neurologiques chez les patients atteints de cancer ont été utilisés pour développer des modèles rongeurs de NPCI et d'atteintes cognitives. Pour l'étude des NPCI, les plus utilisés sont les sels de platine (Oxaliplatine), les alcaloïdes (Vincristine) et les taxanes (Paclitaxel, Docétaxel), bien qu'il en existe d'autre. Dans l'évaluation du syndrome du *chemobrain*, où les antimétabolites (méthotrexate, 5-FU) ont souvent été utilisés, les agents précités ont également été étudiés. Différents modèles précliniques de NPCI et de troubles cognitifs chimio-induits sont présentés de façon non exhaustive dans les tableaux 11 et 12 respectivement.

Il existe un certain nombre de problèmes quant à la modélisation des troubles neurologiques chez les animaux, et notamment pour la comparaison inter-études :

(i) D'abord, il y a peu de cohérence dans le type d'animal utilisé dans les laboratoires. En effet, l'utilisation de rongeurs est commune, mais certains optent pour des souris et d'autres des rats, de sexe, d'âge, et de fond génétique différents. Il est possible que ces différences jouent un rôle dans les variabilités de résultats entre laboratoires. Par exemple, des études montrent une grande variation dans le degré de la neuropathie périphérique, basée sur le fond génétique des souris, aussi bien que sur l'âge des animaux utilisés. Pour exemple, Smith et ses collaborateurs ont testé l'effet du fond génétique sur la NPCI, pour une dose cumulée de Paclitaxel de 4mg/kg à travers 4 injections intra-péritonéal (ip), chez 10 souches de souris différentes. Ils en ont conclu que pour l'allodynie mécanique, les souris DBA/2 est

une souche *high*-allodynique, et que C57BL/6 est une souche *low*-allodynique, mais que ces souches sont comparables au niveau de l'allodynie thermique au froid (Smith et al. 2004). Une autre étude a également effectué une investigation de la susceptibilité de différentes souches de souris à la neurotoxicité induite par l'Oxaliplatine ; pour un même schéma thérapeutique anticancéreux utilisant l'oxaliplatine, les souris de souche Balb-c sont les plus sévèrement atteintes (Marmioli et al. 2017). De plus, on observe également un impact de l'âge chez des souris CD1, où globalement l'hypersensibilité est présente à tous les âges, mais accrue chez les souris jeunes et plus âgées par rapport aux souris adultes (Ruiz-Medina et al. 2013). Un effet sexe a également été mis en évidence : les souris mâles sont plus sujets à l'allodynie que les femelles (Smith, Crager et al. 2004, Hoke and Ray 2014), et à l'opposé les rats femelles Sprague-Dawley (SD) sont plus sensibles et sujettes à la douleur neuropathique que les mâles (DeLeo and Rutkowski 2000).

(ii) De plus, un autre problème majeur avec ces modèles est la question des différences dans le traitement chimiothérapique administré : voie d'administration, dose, fréquence et durée. Ces différents paramètres du protocole chimiothérapeutique, tout comme les méthodes d'évaluation des NPCI, varient considérablement d'une étude à l'autre. Il n'est pas rare de voir que pour une même molécule, différent protocole (dose, fréquence) sont appliqués. Enfin, on constate également des différences dans les délais post-chimiothérapie de l'évaluation des NPCI. Certaines études effectuent les mesures immédiatement après avoir atteint la dose cumulée, d'autres attendent un certain nombre de jours après le traitement, et d'autres encore enregistrent les données jusqu'à la dose cumulée puis plusieurs semaines après le traitement.

En outre il existe un large éventail de modèles précliniques évaluant différents aspects des troubles neurologiques faisant suite à la chimiothérapie. Et pourtant, à notre connaissance, aucun modèle préclinique de troubles neurologiques induits par la CNA-[EPI-DO], utilisée

comme standard dans le cancer du sein, n'a été établi. En effet, la majorité des études évaluent la neurotoxicité associée à un agent chimiothérapique, alors qu'en clinique la prise en charge des cancers fait appel à des polychimiothérapies, basées sur des effets additifs ou synergiques d'agents cytotoxiques qui permettent de réduire les problèmes de résistance tumorale, et permet d'augmenter la fréquence, l'importance et la durée des rémissions. Bien que les effets neurotoxiques du DO soient beaucoup étudiés, aucune étude sur le rongeur ne les rapporte concernant le traitement Taxotère séquentiel, utilisant l'EPI suivi du DO. En connaissant les conséquences des troubles neurologiques induits par la CNA du cancer du sein pour les patientes, des efforts indispensables restent donc à faire pour disposer de nouveaux modèles pertinents, afin de faciliter le développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre les troubles neurologiques induits par la CNA.

Tableau 11 : Différents modèles rongeurs de NPCI et effets neurotoxiques des différents agents utilisés contre le cancer

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
OXAL Ip, 2mg/kg 5 jours consécutifs	Rats SD mâles	Nerf saphène FNIE	Allodynie/hyperalgie mécanique Allodynie au froid (absence au chaud) Diminution vitesse de conduction, Absence de démyélinisation	(Xiao, Zheng et al. 2012)
OXAL Ip, 2 mg/kg 4 jours alternés	Rats SD mâles	FNIE	Hypersensibilité mécanique Diminution densité FNIE	(Boyette-Davis and Dougherty 2011)
OXAL Ip, 4mg/kg 2/sem pdt 4,5 sem	Rats Wistar mâles	Nerf sciatique	Troubles locomoteurs Hypersensibilité mécanique et thermique Démyélinisation et dégénérescence	(Al Moundhri et al. 2013)
OXAL Ip, 3, 6 ou 12mg/kg 1 fois	Rats SD mâles	ME lombaire	Allodynie mécanique (absence hyperalgie) Hypersensibilité au froid (absence au chaud) Augmentation immunoréactivité substance P	(Ling et al. 2007)

(Suite Tableau 11)

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
OXAL Ip, 4mg/kg 2/semaine pdt 4 semaines	Rats SD mâles	Muscle gastrocnemien Fibres motrices	Faiblesse musculaire Diminution densité fibres motrices, Démýélinisation et axonopathy	(Taleb, Bouzobra et al. 2017)
OXAL Iv, 3,5mg/kg 2/semaine pdt 4 semaines	Souris C57BL6, Balb-c, DBA125, AJ, FVB, CD1	DRG FNIE Nerf caudal Nerf sciatique	Hypersensibilité mécanique Hypersensibilité au froid (Balb-c, AJ et FVB) Globalement diminution de la conduction nerveuse, Modification morphométrie DRG, Diminution densité FNIE, (Différences selon souches : BalbC plus sensibles)	(Marmioli, Riva et al. 2017)
FOLFOX : ip, 6mg/kg OXAL + 50mg/kg 5-FU Ou 6mg/kg OXAL 1/semaine pdt 4 semaines	Rats SD mâles	Etude exclusivement comportementale	Hypersensibilité mécanique Hypersensibilité thermique au froid Pas de trouble locomoteur Activité spontanée, comportementale, autonome altérée Absence de déficit dans la coordination motrice	(Di Cesare Mannelli, Maresca et al. 2017)
VINC Iv, 50, 100 ou 150µg/kg 5 injections tous les 2 jours	Rats SD mâles	Peau plantaire	Allodynie/hyperalgie mécanique Absence de démýélinisation	(Authier et al. 2003)

(Suite Tableau 11)

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
VINC Ip, 0,2 mg/kg 1/semaine pdt 5 semaines en augmentant de 0,05mg/kg chaque semaine	Rats mâles	Nerf sciatique	Diminution conduction nerveuse, axonopathie	(Ja'afer et al. 2006)
VINC Ip, 0,1mg/kg 1/jour pendant 3 cycles (séparés de 2 jours)	Rats SD mâles	FNIE Nerf sciatique	Allodynie/hyperalgie mécanique Allodynie au froid (absence au chaud) Diminution densité FNIE, Diminution conduction nerveuse, Diminution expression CNPase	(Meyer, Patten-Mensah et al. 2010)
PAC Ip, 32mg/kg 1 fois	Rats SD mâles	ME lombaire Nerf sciatique Peau plantaire	Hyperalgie mécanique Hypoalgie thermique au chaud Axonopathie, Absence démyélinisation, Cellules Schwann normales	(Authier et al. 2000)
PAC Ip, 0,5, 1, 2, 6 ou 8mg/kg 4 jours alternés	Rats SD mâles	DRG Nerf sciatique	Hyperalgie au chaud Allodynie au froid Allodynie/hyperalgie mécanique Pas de troubles moteurs Absence axonopathie	(Polomano et al. 2001, Flatters and Bennett 2006, Bennett et al. 2011)

(Suite Tableau 11)

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
PAC Iv, 18mg/kg 2 fois séparés de 2jours	Rats SD mâles	DRG Nerf sciatique	Allodynie mécanique Hyperalgie au froid Déficit de coordination motrice Sur-expression ATF-3	(Peters, Jimenez-Andrade et al. 2007)
PAC Ip, 8mg/kg 2/semaines pdt 4 semaines	Rats Wistar mâles	Nerf sciatique	Allodynie mécanique Hyperalgie thermique Axonopathie sans démyélinisation	(Arrieta et al. 2011)
PAC Ip, 16mg/kg 1/semaine pdt 4 semaines Iv, 5, 10, 12,5mg/kg 1/semaines pdt 4 semaines	Rats Wistar femelles	Nerf sciatique	Quelques fibres montrent axonopathie	(Persohn et al. 2005)
PAC Ip, 12,5mg/kg 1/semaine pdt 9 semaines	Rats Wistar femelles	DRGs	Augmentation immunoréactivité ATF-3	(Jamieson et al. 2007)
PAC Iv, 10mg/kg 1/semaine pdt 4 semaines	Rats Wistar femelles	Nerf sciatique Nerf optique	Absence de changements pathologiques	(Gilardini et al. 2012)

(Suite Tableau 11)

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
PAC Iv, 18mg/kg 2 fois tous les 3 jours	Rats SD mâles	Nerf optique Ganglion trijumeau	Augmentation immunoréactivité ATF-3	(Jimenez-Andrade et al. 2006)
PAC Ip, 1mg/kg/2jours pdt 1 semaine	Rats SD mâles	Nerf sciatique FNIE	Allodynie/hyperalgie mécanique Allodynie thermique (froid et chaud) Diminution conduction nerveuse, Diminution densité FNIE, Diminution de l'expression de CNPase, Axonopathie	(Meyer, Patten-Mensah et al. 2013)
PAC Ip, 8 ou 16mg/kg 1/semaine pdt 5 semaines	Rats Wistar femelles	Nerf sciatique Nerf peroneal DRG	Axonopathie	(Cavaletti et al. 1995)
PAC Ip, 4,5, 25 ou 60mg/kg	Souris C57BL/6 femelles	Nerf sciatique	Démyélinisation Présence macrophages	(Mo et al. 2012)

(Suite Tableau 11)

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
PAC Iv, 50 ou 70 mg/kg 1/semaine pdt 4 semaines	Souris BALB/c femelles	Nerf sciatique DRG	Pas de changements pathologiques	(Carozzi et al. 2010)
PAC Ip, 1mg/kg 4 fois tous les 2 jours	Souris des deux sexes, 10 souches	Etude exclusivement comportementale	Hypersensibilité mécanique Hypersensibilité thermique au froid Etude exclusivement comportementale	(Smith, Crager et al. 2004)
PAC Ip, 2mg/kg 1/jour pdt 5 jours consécutifs	Souris CD1 mâles jeunes, adultes et âgées	ME lombaire	Allodynie mécanique Hyperalgie thermique au chaud Augmentation immunoréactivité GFAP Augmentation densité microglie/macrophages Globalement sensibilité accrue jeune>âgé>adulte	(Ruiz-Medina, Baulies et al. 2013)
PAC Ip, 30mg/kg 1 fois ou plusieurs à différents temps d'intervalles	Souris BDF1	DRG Nerfs	Axonopathie Fragmentations de la myéline Phagocytose	(Mimura et al. 2000)
DO Iv, 10mg/kg 1/semaine pdt 4 semaines	Rats Fisher mâles	Nerf caudal Nerf sciatique FNIE	Hypersensibilité thermique au chaud Diminution densité FNIE Diminution conduction nerveuse	(Roglio, Bianchi et al. 2009)

(Suite Tableau 11)

Agent et Dose	Animal	Tissus examinés	Etendu des dommages et symptômes	Références
DO Iv, 5, 10 ou 12,5mg/kg 1/semaine pdt 4 semaines	Rats Wistar femelles	Nerf caudal Nerf sciatique	Diminution conduction nerveuse Diminution densité MTs des petites fibres	(Persohn, Canta et al. 2005)
DO Iv, 10mg/kg	Rats SD mâles	Nerf sciatique DRG	Allodynie/hyperalgie mécanique Allodynie thermique au froid Hypoalgie thermique au chaud Augmentation substance P et CGRP Démýélinisation et atrophie des fibres nerveuses	(Peng et al. 2012)
DO Iv, 5mg/kg 1/semaine pdt 4 semaines	Rats Fisher femelles	Nerf caudal FNIE	Hypoalgie thermique au chaud Diminution conduction nerveuse Diminution densité FNIE	(Cervellini, Bello et al. 2010)

[Selon et modifié de(Han and Smith 2013)]

ip : intra-péritonéale ; iv : intraveineuse ; ATF-3 : facteur de transcription activateur 3 ; CGRP : peptide lié au gène de la calcitonine ; SD : Sprague-Dawley ; FNIE : Fibre nerveuse intra-épidermique ; DRG : ganglion rachidien de la racine dorsal ; PAC : Paclitaxel ; VINC : Vincristine ; DO : Docétaxel ; OXAL : Oxaliplatine ; ME : Moelle épinière ; GFAP : Protéine acide fibrillaire

Tableau 12 : Différents modèles rongeurs de troubles cognitifs chimio-induits et effets neurotoxiques des différents agents utilisés contre le cancer

Chimiothérapie	Animal	Comportement	Références
Methotrexate 37,5 mg/kg 5-FU 75 mg/kg ip 1/semaine pdt 3 semaines	Souris BALB/C	Piscine de Morris, NOR Mémoire spatiale et non spatiale altérée	(Winocur, Vardy et al. 2006, Winocur, Henkelman et al. 2012)
Methotrexate 3,2mg/kg 5-FU 75mg/kg	Souris Swiss-Webster	<i>Autoshaping-operant procedure</i> Diminution des capacités d'apprentissage	(Foley, Raffa et al. 2008)
Methotrexate 37,5mg/kg 5-FU 75mg/kg Cyclophosphamide 40mg/kg (mélange CMF) ip 1/semaine pdt 4 semaines	Rat Wistar	Piscine de Morris, Mémoire et apprentissage altérés Diminution de la prolifération cellulaire hippocampique (BrdU)	(Briones and Woods 2011)
5-FU 25mg/kg iv tous les 2 jours pdt 2 semaines	Rat Lister	<i>Context-dependant conditioned emotional responses test, SOR</i> Diminution de la mémoire de travail et de la composante émotionnelle Diminution de la prolifération cellulaire hippocampique (Ki67)	(ElBeltagy, Mustafa et al. 2010)
5-FU 37,5mg/kg ip 1/semaine pdt 3 semaines	Souris C57BL/6J	Croix surélevée, Nage forcée, Piscine de Morris, NOR Pas d'impact sur la réactivité émotionnelle Pas d'impact sur la mémoire à long terme Altération de la flexibilité et hyperactivité face à la nouveauté Diminution prolifération cellulaire hippocampe (BrdU) Toxicité hippocampe <i>in vitro</i>	(Dubois, Lapinte et al. 2014)

(Suite Tableau 12)

Chimiothérapie	Animal	Comportement	Références
Methotrexate 250mg/kg iv	Rat Wistar	Piscine de Morris, NOR Altération de la mémoire spatiale et non spatiale Diminution de la prolifération cellulaire hippocampique (Ki67)	(Seigers, Schagen et al. 2008)
Methotrexate 75mg/kg iv 1/semaine pdt 2 semaines	Rat Lister	SOR Altération de la mémoire spatiale Diminution de la prolifération et de la survie cellulaire hippocampe (Ki67 – BrdU)	(Lyons, ElBeltagy et al. 2011)
Cisplatine 2,3mg/kg ip 1/jour pdt 5 jours 2 cycles séparés de 5 jours	Souris C57BL/6J	NOR, SOR, Labyrinthe en Y Diminution des performances cognitives Diminution MBP cortex cingulaire Diminution doublecortine+ hippocampe	(Chiu, Maj et al. 2017)
Oxaliplatine 8 ou 12mg/kg Ou OXAL + 5-FU (75mg/kg) ip 1 fois	Rat Wistar	NOR, Piscine de Morris, Conditionnement à la peur (contexte et indicé) Déficit reconnaissance nouvel objet Pas de déficit mémoire spatiale lorsque seul Combinaison toxique pour les taches hippocampo-dépendantes	(Fardell, Vardy et al. 2012)
Cyclophosphamide 40mg/kg ip	Souris ICR	Evitement passif, NOR Déficits cognitifs Diminution du nombre de cellules comarquées Ki67 - Doublecortine	(Yang, Kim et al. 2010)

(Suite Tableau 12)

Chimiothérapie	Animal	Comportement	Références
Cyclophosphamide 30mg/kg iv tous les 2 jours, 7 fois	Rat Lister	SOR Pas de déficit Diminution de la survie cellulaire Pas d'effet sur la prolifération cellulaire (BrdU - Ki67)	(Lyons, ElBeltagy et al. 2011)
Doxorubicine 2mg/kg ip 1/semaine pdt 4 semaines	Rat nude athymique	SOR, Conditionnement à la peur (contexte et indicé) Déficit cognitif Diminution de la neurogenèse hippocampique (BrdU)	(Christie, Acharya et al. 2012)
Paclitaxel 20mg/kg ip tous les 2 jours pdt 4 semaines (12 fois)	Souris C57BL/6N	Piscine de Morris, Croix surélevée, Nage forcée Déficit mémoire spatiale Pas d'effet sur le comportement affectif Cytotoxicité des cellules souches neurales Diminution de la prolifération cellulaire hippocampique	(Huehnchen, Boehmerle et al. 2017)
Docétaxel 6 ou 10 mg/kg 1/semaine pdt 3 semaines Ou 1 fois 10mg/kg	Rat Wistar	NOR, Piscine de Morris Léger déficit reconnaissance nouvel objet Pas d'effet pour 10 mg/kg	(Fardell, Vardy et al. 2013)
Docétaxel 8 mg/kg ip intermittent Ou Libération continue (total de 32 mg/kg)	Souris CD1	NOR, Piscine de Morris Déficit de la reconnaissance d'objet Diminution es performances de la mémoire spatiale Activation astrocytaire (GFAP)	(Fardell, Zhang et al. 2014)
Docétaxel 1mg/kg iv 1/semaine pdt 4 semaines	Rat Wistar	NOR, SOR Déficit de la mémoire spatiale Pas de déficit dans la reconnaissance d'objet	(Callaghan and O'Mara 2015)

(Suite Tableau 12)

Chimiothérapie	Animal	Comportement	Références
Docétaxel 33mg/kg iv	Souris C57BL/6	NOR, SOR, Labyrinthe de Barnes, Conditionnement à la peur, <i>Simple choice reaction time task</i> (SCRTT) Déficit mémoire spatiale et non spatiale Pas de déficit dans le labyrinthe de Barnes Diminution du contrôle inhibiteur Pas d'effet sur Ki67+ ni doublecortine+	(Seigers, Loos et al. 2015, Seigers, Loos et al. 2016)

[Selon et modifié de (Dietrich, Prust et al. 2015)]

ip : intra-péritonéale ; iv : intraveineuse ; NOR : *New object recognition* pour Reconnaissance d'un nouvel objet ; SOR : *Spatial object recognition* pour reconnaissance spatiale ; 5-FU : 5-fluorouracile ; BrdU : bromodésoxyuridine ; GFAP : protéine acide fibrillaire

V.2. Elaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques : utilisation de la Duloxétine

La DU, commercialisée en France sous le terme de Cymbalta, a été créée par les chercheurs David Robertson, David Wong (également codécouvreur de la fluoxétine) et Joseph Krushinski, et dont le brevet a été accordé en 1990 (Wong et al. 1988). Mécaniquement, ce psychotrope est un inhibiteur des transporteurs de la sérotonine (SERT) et de la noradrénaline (NET), et inhibe donc la recapture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA) (Wong et al. 1993, Karpa et al. 2002).

V.2.1. Généralités : indications et pharmacologie

- **Indications**

La DU est approuvée par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food drug administration* ou FDA) et par l'Union européenne dans le

traitement de l'épisode dépressif majeur (Detke et al. 2002), de l'anxiété généralisée et de la neuropathie périphérique diabétique (Goldstein et al. 2005). Dans l'Union européenne, la commission a également accordé la mise sur le marché de la DU pour le traitement de l'incontinence urinaire d'effort. En 2008, la FDA accorde également une autorisation à la DU pour le traitement de la fibromyalgie, alors que la commission d'autorisation de mise sur le marché européenne donne un avis défavorable à cette indication due à l'absence de preuve tangible d'efficacité.

La DU est disponible sous forme de comprimés de 20 à 160 mg. Elle est prise par voie orale, avec ou sans nourriture, avec une durée du traitement individualisée. La posologie initiale recommandée est de 60 mg par jour en une prise, pouvant aller jusqu'à 120 mg au maximum par jour.

- **Pharmacologie**

Par l'inhibition de la SERT et de la NET, la DU augmente les concentrations de 5-HT et de NA au niveau de la fente synaptique. La DU peut être considérée comme sélective de la recapture de la 5-HT et de la NA puisqu'elle ne présente pas d'affinité significative pour les récepteurs de la recapture dopaminergiques, adrénergiques, cholinergiques, histaminergiques, opioïdes, glutamatergiques, et les transporteurs de la recapture du GABA (Wong, Bymaster et al. 1993). Par conséquent, elle appartient à la famille des antidépresseurs sélectifs de la recapture de la 5-HT et de la NA (*selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor* ou SSNRI). Si la DU inhibe de manière préférentielle la recapture de la 5-HT ou de la NA, ou si elle inhibe leur recaptage de façon équivalente reste obscure. Les études de liaison *in vitro* et *ex vivo* utilisant des tranches d'hippocampe de rat ont démontré que la DU est deux fois plus puissante pour inhiber la recapture de la 5-HT que la NA (Kasamo et al. 1996, Karpa,

Cavanaugh et al. 2002). Cependant, des études *in vivo* indiquent une inhibition équivalente par la DU de l'absorption de la 5-HT et de la NA (Karpa, Cavanaugh et al. 2002).

Il a également été démontré que les métabolites de la DU, après oxydation, ne semblent pas avoir d'effets pharmacologiques (Lantz et al. 2003, Bymaster et al. 2005, Stahl et al. 2005).

V.2.2. Du dans le traitement des douleurs chroniques

V.2.2.1 DU et traitement des douleurs chroniques non associées à la chimiothérapie

Des travaux ont documenté des effets analgésiques pour le traitement des syndromes de douleur chronique, en particulier dans le cas des neuropathies périphériques diabétiques et dans le traitement de la fibromyalgie. Une étude Cochrane en 2014 référence les effets pharmacologiques de la DU dans huit études portant sur 2728 participants atteints de neuropathie diabétique douloureuse, de fibromyalgie ou de symptômes physiques douloureux dans la dépression. La dose habituelle de DU était de 60 mg. À cette dose, des preuves moyennement solides indiquent que la DU réduit la douleur dans la neuropathie périphérique diabétique douloureuse, la fibromyalgie ou la douleur dans la dépression. Le taux relatif d'amélioration est de 50 % associé à l'administration de 60 mg de DU par jour, alors qu'une dose de 20 mg n'est pas efficace, et qu'une dose de 120 mg ne se montre pas plus bénéfique (Lunn, Hughes et al. 2014). La DU réduit également la douleur liée à la neuropathie diabétique chez les personnes âgées (Skljarevski et al. 2012).

La DU améliore également les symptômes de douleur neuropathique chez des modèles animaux rongeurs, notamment des modèles de neuropathie diabétique ou de ligature du nerf (Iyengar et al. 2004, Mixcoatl-Zecuatl and Jolivald 2011, Wattiez et al. 2011, Kawasaki-Yatsugi et al. 2012).

La DU, dont l'efficacité bien que partielle, est connue dans le traitement de divers syndromes douloureux, et approuvée pour le traitement de la neuropathie diabétique douloureuse. La DU

est également considérée comme un traitement de première intention de la douleur neuropathique non chimio-induite (Pachman, Watson et al. 2014). On peut alors se demander quels sont les effets de la DU dans le cas de la prise en charge des NPCI.

V.2.2.2 DU et traitement des douleurs chroniques associées à la chimiothérapie

Nous avons vu précédemment que la NPCI est multifactorielle, et difficile à prendre en charge. Compte tenu des effets bénéfiques, bien que partiels, de la DU sur les douleurs chroniques, en particulier dans le traitement de la douleur liée à la neuropathie périphérique diabétique, des essais de l'efficacité de la DU dans le traitement de la NPCI ont été effectués.

- **Etudes cliniques**

Un nombre limité d'essais ont étudié l'utilisation de la DU dans le traitement des NPCI. Parmi elles, une étude pilote portant sur 39 patients atteints de cancer colorectal et présentant une neuropathie périphérique chronique induite par l'oxaliplatine a évalué les effets de la DU (Yang et al. 2012). Dans cette étude, la DU a été administrée à 60 mg/jour, et la sévérité de la douleur neuropathique a été évaluée par l'utilisation de l'EVA et par les critères de toxicité communs pour les événements indésirables de l'Institut National pour le Cancer, version 3 (NCI-CTCAE v3.0). La DU, sans interférer avec la chimiothérapie, a conduit à l'amélioration du score EVA pour 19 patients (48,7 %). Parmi eux, neuf (47,4 %) ont montré une diminution de la sévérité, alors que les 10 autres patients (52,6 %) présentaient un score stable selon le NCI-CTCAE v3.0. Yang et ses collaborateurs ont également évalué la fonction rénale et hépatique suite à la DU, fonctions qui ne sont pas altérées dans cette étude. En 2013, un essai randomisé de phase 2 en double aveugle contre placebo (Smith, Pang et al. 2013) a comparé l'utilisation de la DU (60mg/jour) avec un placebo pendant cinq semaines sur 231 patients ayant des douleurs induites par l'oxaliplatine ou le paclitaxel. Les auteurs

rapportent que la DU entraîne une réduction significative plus importante de la douleur chez certains patients par rapport au placebo, et que la plupart des avantages ont été observés chez les patients ayant reçu de l'oxaliplatine. C'est sur ces bases que la DU a été signalée comme traitement recommandé pour la prise en charge des NPCI dans les lignes directrices de la Société d'oncologie clinique (*Society of Clinical Oncology*) (Hershman, Lacchetti et al. 2014).

Plus récemment, les effets de la DU pour lutter contre les NPCI chez 34 patients ayant suivi un traitement chimiothérapeutique à base d'oxaliplatine, de paclitaxel, de vincristine ou de bortézomib ont été évalués (Hirayama et al. 2015). Les patients ont reçu 20mg/jour de DU par voie orale pendant la première semaine, puis 40 mg/jour pendant les 3 semaines suivantes. Après une période de repos de 2 à 3 semaines, le traitement a été repris pendant 4 semaines supplémentaires. La sévérité de l'engourdissement et de la douleur a été évaluée à l'aide de l'échelle EVA. Une diminution des scores moyens d'EVA pour l'engourdissement et la douleur a été observée pendant les périodes d'administration de DU, alors qu'un syndrome de fatigue a été observé chez six des 34 participants (17,6%). Enfin, Kanbayashi et ses collaborateurs (Kanbayashi et al. 2017) ont récemment cherché à identifier les facteurs qui peuvent prédire l'utilité de la DU dans le traitement des NPCI par le cisplatine, l'oxaliplatine, le paclitaxel, le docétaxel, la vincristine ou le bortezomib. Dans cette étude, la DU semble partiellement efficace pour 28 des 95 patients (29,5 %), parmi lesquels la DU s'avère véritablement efficace pour 7 patients, et plus modestement pour les 21 autres. Les auteurs suggèrent qu'il existe des prédicteurs significatifs pour les effets de la DU, incluant la taille, l'utilisation de la chimiothérapie (dose, fréquence) et la localisation des symptômes. Tout comme cela a été suggéré par Smith et ses collègues (Smith, Pang et al. 2013) d'autres analyses dans ce travail suggèrent également que la DU est moins efficace pour contrer les

symptômes neurologiques faisant suite au paclitaxel, et plus efficace contre les NPCI par l'oxaliplatine, même si les différences ne sont pas significatives.

- **Etudes précliniques**

On retrouve également très peu d'études précliniques sur les effets de la DU contre les NPCI. De plus, ces travaux évaluent les effets aigus de l'administration de la DU, souvent en comparaison avec d'autres molécules, et ne présentent pas les effets chroniques de la DU sur les symptômes neuropathiques chimio-induits.

Il a été montré que la DU à 30 mg/kg ou 100 mg/kg, administrée par voie orale (*per os*) chez des souris, conduit à un effet anti-allodynique mécanique, via l'augmentation du seuil de retrait de la patte qui est fortement diminué suite à l'administration de paclitaxel (Ito et al. 2012). Cet effet dure entre 1 et 4 heures après l'administration de DU. Malgré l'amélioration aiguë des symptômes, la DU dans cette étude n'a pas permis d'atteindre le seuil contrôle (sans chimiothérapie) chez les souris (Ito, Tajima et al. 2012). Une autre étude révèle que la DU exerce également des effets anti-hyperalgie au froid induit par l'oxaliplatine chez des rats (Balayssac et al. 2014). Dans cette étude, la DU injectée par voie intra-péritonéale (ip) à 2,5 mg/kg a permis de diminuer l'hypersensibilité thermique au froid, jusqu'au niveau contrôle, 30 minutes après son administration (Balayssac, Ling et al. 2014). Malheureusement, dans ces travaux aucune donnée n'informe sur la dissipation ou le maintien de cet effet dans le temps. Les effets aigus anti-allodynique mécanique et thermique au froid de la DU ont également été démontrés et confirmés chez des rats présentant ces symptômes à la suite d'un traitement au bortezomib (Yamamoto et al. 2015). Par voie ip, la DU à 3 et 10 mg/kg s'est avérée inefficace, alors qu'une dose de 30 mg/kg entraîne une diminution des symptômes 1h après son injection. Cet effet se dissipe 2h post-administration (Yamamoto, Kawashiri et al. 2015).

Plus récemment, il a été démontré que la DU à 15 mg/kg *per os* permet d'atténuer pendant 30 minutes l'allodynie mécanique induit par l'oxaliplatine ou le mélange FOLFOX (oxaliplatine et 5-FU) chez des rats, 15 minutes après son administration (Di Cesare Mannelli, Maresca et al. 2017). Enfin, Toyama et ses collègues ont évalué les effets de la DU à 10 ou 30 mg/kg *per ip* chez des souris présentant une hypersensibilité mécanique et thermique induit par l'oxaliplatine (Toyama et al. 2017). L'injection de DU entraîne une diminution partielle de l'hypersensibilité mécanique 1 heure après son administration, mais n'exerce pas d'effet sur l'hypersensibilité thermique (Toyama, Shimoyama et al. 2017).

A travers ces études, la DU a globalement été démontrée pour réduire de façon aigüe et partielle l'allodynie mécanique et/ou thermique au froid chez des rats traités par chimiothérapie bortézomib (Yamamoto, Kawashiri et al. 2015) et oxaliplatine (Balayssac, Ling et al. 2014, Di Cesare Mannelli, Maresca et al. 2017, Toyama, Shimoyama et al. 2017), et chez les souris traitées avec du paclitaxel (Ito, Tajima et al. 2012).

V.2.2.3 Mécanismes des propriétés analgésiques de la DU

Même si leur efficacité est en partie limitée, les antidépresseurs sont devenus des médicaments courants pour le traitement de la douleur neuropathique, et restent parmi les meilleurs traitements pharmacologiques. La recherche préclinique a permis de progresser dans la compréhension des bases de leur action thérapeutique, mais les mécanismes de soulagement de la douleur ne sont pas encore entièrement décrits.

La capacité des antidépresseurs pour inhiber la réabsorption de monoamine est généralement considérée comme le principal mécanisme conduisant à leurs effets analgésiques. Le mécanisme précis du soulagement de la douleur n'est pas clair, bien que l'implication accrue de la 5-HT et de la NA dans les voies inhibitrices descendantes ait été évoquée comme des mécanismes plausibles (Mixcoatl-Zecuatl and Jolivald 2011). En effet, la

5-HT et la NA sont connues comme les principaux médiateurs endogènes des mécanismes de modulation du message nociceptif dans les voies descendantes de la douleur. Ceci pourrait expliquer les propriétés de modulation de la douleur de la DU, notamment sur les voies de contrôles descendantes inhibitrices noradrénergiques et sérotoninergiques, schématisées sur la figure 9 (Yoshimura and Furue 2006, Onutu 2015, Llorca-Torralba et al. 2016). Certains auteurs proposent que la composante nécessaire de l'action des antidépresseurs sur la douleur neuropathique soit principalement le système noradrénergique, mais que la composante sérotoninergique puisse moduler cette action. A l'inverse, d'autres proposent que ce soit la composante sérotoninergique qui est prédominante, et enfin certains suggèrent l'implication des deux systèmes de façon équivalente. Bien que l'implication prédominante ou équivalente de l'une ou l'autre de ces voies soit encore obscure, l'effet thérapeutique de la DU serait dépendant à la fois des récepteurs adrénérergiques et sérotoninergiques au niveau de la ME. En particulier l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B/1D} et α ₂-adrénérergiques dans la ME serait impliquée dans le soulagement de la douleur neuropathique (Tsukamoto et al. 2010, Sun et al. 2014, Onutu 2015, Ucel et al. 2015). Ceci a également été démontrée dans les modèles de lésion nerveuse (Obata et al. 2001, Honda et al. 2006), dans un modèle d'hyperalgie évoquée par le formol (Sasaki et al. 2001), dans un modèle de douleur post-opératoire (Sun, Li et al. 2014), et également dans un modèle de neuropathie diabétique où la DU présente une activité anti-allodynique (Mixcoatl-Zecuatl and Jolivalt 2011). L'activation des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₁, couplés à une protéine G_q et G_i respectivement, a pour conséquences d'activer les interneurons inhibiteurs présents au niveau de la corne dorsal de la ME, et d'inhiber les neurones nociceptifs de projection spinaux, modulant ainsi négativement la transmission du message nociceptif au niveau spinal. L'inhibition du neurone de projection de message douloureux implique également l'activation des récepteurs alpha-2 adrénérergiques couplés à une protéine G_i.

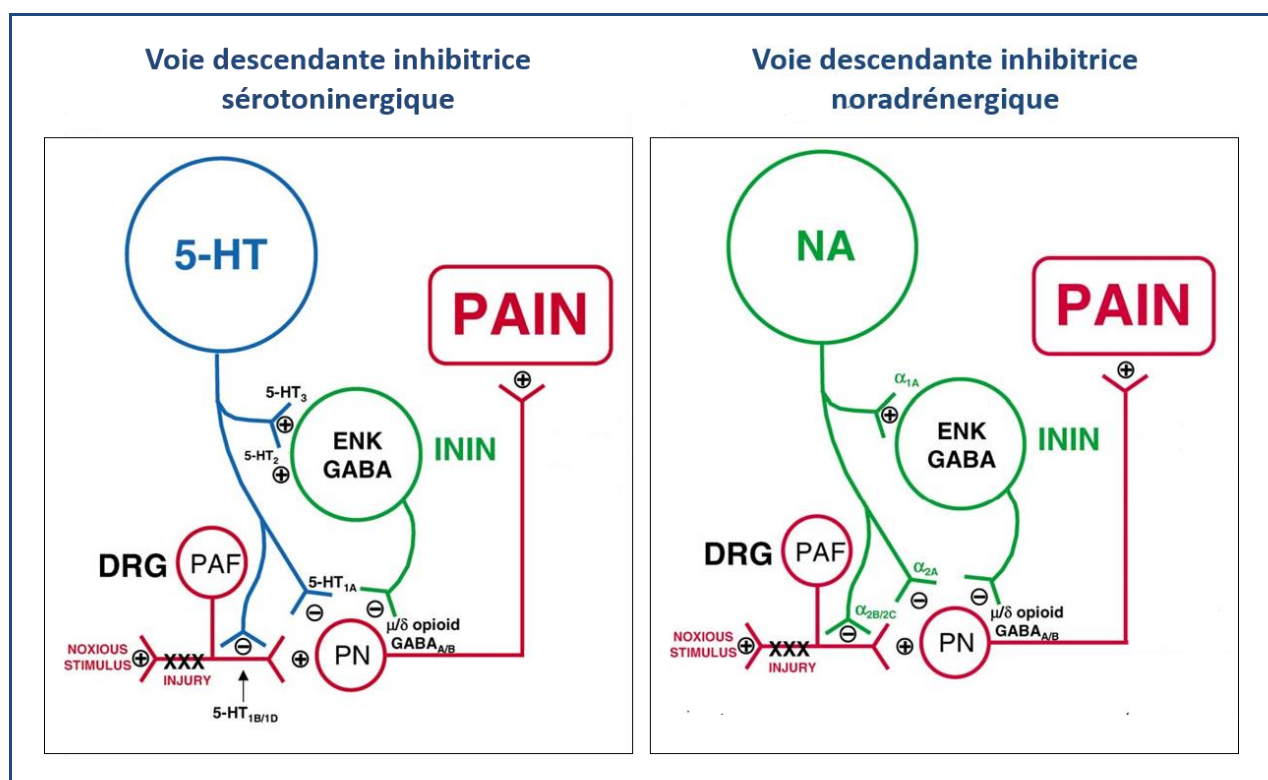


Figure 9. Voies des contrôles descendants inhibiteurs sérotoninergiques et noradrénergiques

Au niveau de la corne dorsale de la ME on retrouve plusieurs classes de récepteurs à la sérotonine et à la noradrénaline. Leur localisation neuronale est importante pour la modulation du message nociceptif. Sur le côté gauche, des mécanismes impliqués dans l'inhibition descendante sérotoninergique sont indiqués. Sur le côté droit ceux qui de l'inhibition descendante noradrénergique sont montrés. Des actions sont exercées au niveau des fibres afférentes primaires (PAF), des neurones de projection (PN) et des interneurons inhibiteurs (ININ). Les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/1D} et 2-AR suppriment l'activité neuronale, tandis que l'excitabilité cellulaire est renforcée par les récepteurs 5-HT₂, 5-HT₃ et 1-AR.

DRG : ganglions de la racine dorsale ; 5-HT : sérotonine ; NA : noradrénaline ; ENK : Enképhaline (Millan 2002)

Si les mécanismes de la DU en administration aigue sont identiques aux mécanismes impliqués lors d'une administration chronique est une question encore obscure à l'heure actuelle. L'efficacité thérapeutique de la DU n'est pas évidente avant plusieurs semaines, ce qui suggère que les élévations des taux de monoamines au niveau des fentes synaptiques ne sont pas seuls responsables des effets de la DU (Karpa, Cavanaugh et al. 2002). Cela implique que la DU induit des modifications à long terme de la neurotransmission monoaminergique

(Blier and Bouchard 1994). Des preuves de changements adaptatifs dans la neurotransmission monoaminergique suite à une administration à long terme de la DU ont été fournies, avec notamment une désensibilisation des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques et 5-HT₁ (Rueter et al. 1998, Rueter et al. 1998). Malheureusement, les mécanismes qui sous-tendent les changements adaptatifs dans le SNC après l'administration chronique de la DU ne sont pas entièrement compris, et sont à élucider (Karpa, Cavanaugh et al. 2002).

V.2.3. Effets pro-cognitifs et neuroprotecteurs de la DU

- **Effets pro-cognitifs**

Les troubles cognitifs sont souvent signalés chez les patients atteints de trouble dépressif majeur (TDM) (Baune et al. 2010, Greer, Sunderajan et al. 2014, Pehrson et al. 2015, Rosenblat et al. 2015). Plusieurs domaines cognitifs, y compris les fonctions exécutives, l'attention, la mémoire, la vitesse de traitement et les compétences psychomotrices sont affectés chez les patients, à la fois pendant la phase symptomatique et la phase de "rémission" du TDM (Marazziti et al. 2010, Lee et al. 2012, Bora et al. 2013, Bortolato et al. 2014). De ce fait, plusieurs chercheurs ont étudié les effets cognitifs de divers antidépresseurs, dont la DU dans le contexte de la prise en charge du TDM (Herrera-Guzman et al. 2010, Greer, Sunderajan et al. 2014, Keefe et al. 2014, Mahableshwarkar et al. 2015, Rosenblat, Kakar et al. 2015).

Il a été noté que la DU exerce des effets positifs sur différents domaines de la cognition qui sont altérés chez les patients TDM. Bien que la DU exerce peu d'effets sur les fonctions exécutives (Mahableshwarkar, Jacobsen et al. 2015, Rosenblat, Kakar et al. 2015), elle s'avère efficace sur la vitesse psychomotrice, le rappel mnésique différé (Greer, Sunderajan et al. 2014, Mahableshwarkar, Jacobsen et al. 2015, Rosenblat, Kakar et al. 2015), la mémoire de travail et l'attention (Herrera-Guzman, Herrera-Abarca et al. 2010). Ainsi, les

patients TDM rapportant des déficits cognitifs obtiennent, suite au traitement par la DU, des améliorations cognitives qui sont indépendantes de l'amélioration symptomatique de la dépression. L'amélioration cognitive induite par la DU semble donc se produire indépendamment des effets antidépresseurs (Greer, Sunderajan et al. 2014).

- **Effets neuroprotecteurs**

Plusieurs études suggèrent un effet neuroprotecteur de la DU dans différents modèles de lésions cérébrales. Des études précliniques montrent que la DU exerce des effets neuroprotecteurs à la suite de lésions induites par une ischémie cérébrale. Par exemple, une étude a examiné l'effet neuroprotecteur de la DU sur les dommages neuronaux induits par l'hypoperfusion chronique, en utilisant un modèle d'occlusion bilatérale permanente des artères carotides communes chez le rat (Park and Lee 2018). Dans ces travaux, la DU à 20 mg/kg est capable d'atténuer les dommages neuronaux, en évitant la mort neuronale dans la région de la corne d'Ammon 1 (CA1) de l'hippocampe causée par l'ischémie cérébrale (Park and Lee 2018). Chez la souris, l'effet neuroprotecteur, suite à une ischémie cérébrale globale transitoire, d'un prétraitement à la DU au niveau de la région CA1 de l'hippocampe a été étudié (Lee et al. 2016). Alors qu'à 20 mg/kg la DU ne présente aucun effet, elle protège les neurones pyramidaux hippocampiques à 40 mg/kg suite à la lésion ischémique.

Les effets de la DU sur le comportement des souris et les dommages neuronaux suite à l'excitotoxicité induite par l'injection d'acide kaïnique (AK) ont également été étudiés (Choi et al. 2015). Dans ce travail, la DU n'a montré aucun effet sur les comportements semblables aux crises de convulsion induite par l'AK. Cependant, la DU à 10 mg/kg permet de réduire la mort neuronale dans la région CA3 de l'hippocampe 72h après l'administration d'AK, et montre un effet neuroprotecteur notable à 20 et 40 mg/kg (Choi, Park et al. 2015).

La DU est également efficace pour prévenir la mort cellulaire *in vitro* induite par un stress oxydant. En effet, il est connu qu'une production accrue de ROS, causée par un

dysfonctionnement mitochondrial, peut conduire à la mort neuronale. Dans une étude en 2018, des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été prétraitées avec de la DU pendant 24h suivie d'une exposition de 24 heures à la roténone qui induit un stress oxydant (Engel et al. 2018). Il a été démontré que la DU antagonise la surproduction de ROS induite par la roténone, et évite la mort cellulaire des cellules SH-SY5Y (Engel, de Oliveira et al. 2018).

Ces différents travaux s'accordent sur le fait que l'activité neuroprotectrice de la DU semble être sous-tendue par des mécanismes antioxydants via l'augmentation de l'expression d'enzymes antioxydantes (Lee, Park et al. 2016) et antagonisant ainsi la surproduction de ROS (Engel, de Oliveira et al. 2018), mais également anti-inflammatoires, avec une diminution de l'activation microgliale et astrocytaire accompagnée d'une diminution des niveaux de TNF- α et d'IL-1 β dans les régions hippocampiques (Choi, Park et al. 2015, Lee, Park et al. 2016, Park and Lee 2018). L'activation des récepteurs à la 5-HT sur les monocytes permet de diminuer le relargage de TNF- α induit par le lipopolysaccharide (LPS) (Durk et al. 2005). Ceci suggère que la 5-HT est impliquée dans les processus anti-inflammatoires, et que la DU, qui augmente les taux de sérotonine, peut exercer des effets anti-inflammatoires. Plus récemment il a également été démontré que l'administration de DU est liée à une augmentation du taux d'IL-10 dans le sérum de souris (Ohgi et al. 2013), qui est connue comme étant une cytokine anti-inflammatoire essentielle pour inhiber la production de TNF- α et d'IL-6 (de Waal Malefyt et al. 1991).

- **Potentiels effets neurogéniques**

Il existe des preuves d'un lien entre antidépresseurs et neurogenèse hippocampique adulte. Différentes études montrent que l'administration chronique d'antidépresseurs, compatible avec le temps pour l'action thérapeutique, favorisent la prolifération des cellules

nouvellement nées (Encinas et al. 2006, Wang et al. 2008) ainsi que la neurogenèse (Malberg et al. 2000, Lucassen et al. 2010). Bien que ceci soit très bien démontré pour la fluoxétine (inhibiteur de la recapture de la sérotonine), seulement une étude unique à ce jour a évalué la DU dans ce contexte (Marlatt et al. 2010), ne montrant pas d'effet neurogénique de la DU à 2, 6 ou 18 mg/kg chez des souris saines.

V.2.4. Effets secondaires indésirables et contre-indications de la DU

Les effets indésirables d'un traitement pharmacologique sont un facteur important dans la prise de décision en matière de thérapeutique. La plupart des patients recevant de la DU présentent au moins un effet secondaire (Lunn et al. 2009, Lunn, Hughes et al. 2014, Riediger et al. 2017). Bien que les événements indésirables graves soient rares (Lunn, Hughes et al. 2009, Lunn, Hughes et al. 2014), ces effets secondaires sont fréquents à 60 mg, et en particulier à 120 mg de DU par jour (Lunn, Hughes et al. 2014), et non négligeables puisqu'ils sont responsables pour 20 à 25 % des patients de l'arrêt du traitement DU (Goldstein, Lu et al. 2005, Gahimer et al. 2007, Skljarevski et al. 2009, Skljarevski et al. 2010, Chappell et al. 2011, Yang, Lin et al. 2012, Kanbayashi, Inagaki et al. 2017). Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés (fréquence ≥ 30 %) pour la DU comprennent des troubles gastro-intestinaux, tel que des douleurs abdominales, des constipations, des diarrhées, des nausées ou des vomissements ; des troubles du sommeil (insomnie, fatigue) ; et des troubles des émotions et du comportement, tel que de l'agitation, de l'agressivité, une dépression aggravée, une anxiété, une dépersonnalisation ou même un état suicidaire (Lunn, Hughes et al. 2009). La DU s'accompagne également, avec une fréquence de 20-25 %, de troubles cardiovasculaires (vertiges, bouffées de chaleur, élévation de la pression artérielle), métaboliques (troubles de l'appétit, élévation d'enzymes hépatiques), et du système nerveux (tremblements, migraine). Par ailleurs, la DU peut, dans certains cas (fréquence ≤ 15 %), entraîner des problèmes

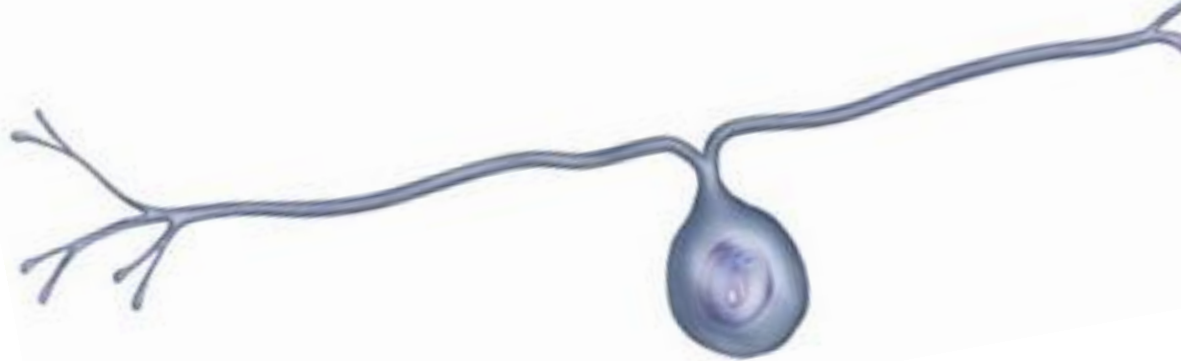
musculosquelettiques (douleur, spasmes, mâchoire serrée), de la peau (démangeaisons, transpiration) et sexuels (Goldstein, Lu et al. 2005, Lunn, Hughes et al. 2009).

V.3. Elaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques : utilisation de l'Allopregnanolone

L'allopregnanolone (AP) est un neurostéroïde synthétisé *in vivo* à partir de la conversion successive de la progestérone en 5- α -dihydroprogestérone (par la 5 α -réductase), puis en AP (par la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase). Il est bien établi que l'AP est impliquée dans la modulation de processus neurodégénératifs, neuroinflammatoires, antidépresseurs, anxiolytiques et analgésiques (Ciriza et al. 2004, Ciriza et al. 2006, Patte-Mensah, Kibaly et al. 2006, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011, Melcangi and Panzica 2014, Noorbakhsh et al. 2014, Patte-Mensah, Meyer et al. 2014, Schule et al. 2014, Guennoun et al. 2015). Les effets neuroprotecteurs ont été montrés dans de nombreux modèles animaux. Par exemple, l'AP supprime les symptômes associés à la maladie de Niemann-Pick de type C chez des souris (Griffith, Couture et al. 2014), et ceux retrouvés chez des souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer (Wang et al. 2010, Chen et al. 2011, Singh et al. 2012, Sun et al. 2012, Irwin et al. 2015). L'AP exerce également des effets positifs dans les modèles animaux mimant la maladie de parkinson (Adeosun et al. 2012, Melcangi and Panzica 2014, Guennoun, Labombarda et al. 2015, Nezhadi et al. 2016), et dans des modèles de sclérose en plaques (Noorbakhsh, Baker et al. 2014). Ces observations ont d'ailleurs contribué à la mise en place de divers essais thérapeutiques à base d'AP contre différents troubles neurodégénératifs. En effet, l'AP fait l'objet d'essais cliniques pour traiter les déficits cognitifs de la maladie d'Alzheimer (phase I, débutée en 2014, NCT0221622), les lésions traumatiques cérébrales (phase II, débutée en 2012, NCT01673828) ou encore les tremblements et ataxies liés au syndrome de l'X fragile (phase II, débutée en 2015, NCT02603926).

Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré que l'AP (4 mg/kg/2jours) contrecarre efficacement les NPCI (oxaliplatine ou vincristine) sans altérer l'efficacité antitumorale de l'agent chimiothérapique (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011, Taleb, Bouzobra et al. 2017). En effet, dans les modèles induits par l'oxaliplatine ou la vincristine, l'AP supprime les symptômes d'allodynie et d'hyperalgie mécaniques, ainsi que l'allodynie thermique au froid et au chaud. L'AP permet également de prévenir ou de restaurer la conduction nerveuse ainsi que l'intégrité du nerf sciatique et des fibres nerveuses intra-épidermiques altérées par la chimiothérapie (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011). Cependant, les actions pléiotropiques de l'AP, en particulier ses effets favorisant la prolifération cellulaire, entravent le développement de thérapies sélectives/ciblées (Taleb, Patte-Mensah et al. 2018). Par exemple, alors que la neurogenèse induite par l'AP peut servir à compenser la perte neuronale dans les cerveaux dégénératifs, la prolifération cellulaire évoquée par l'AP est contre-indiquée chez les patients atteints de cancers stéroïdes- ou hormono-dépendants. Toutefois, malgré cette réserve limitée à certains cas, l'AP demeure une molécule de référence majeure dans le domaine de la neuroprotection.

HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE LA THESE



Bien que les cancers du sein se situent au premier rang des cancers incidents chez la femme, on observe une augmentation du nombre de survivants, conséquences des avancées dans les traitements anticancéreux. La CNA du cancer du sein permet aux patientes qui en bénéficient d'obtenir une meilleure éradication, et de surcroît plus précoce, de la maladie métastatique. En permettant de tester la chimio-sensibilité tumorale, la CNA offre également la possibilité d'une adaptation individuelle à la chimiothérapie. Mieux encore, en rendant possible la chirurgie et en offrant la possibilité d'une conservation mammaire, la CNA améliore alors la préservation de l'intégrité physique et psychologique des patientes, pour lesquelles la perte d'un sein a un impact sur le plan physique mais également psychologique, en modifiant souvent l'image de soi.

Malheureusement, du fait de sa toxicité sur les cellules saines, la CNA s'accompagne d'effets secondaires, notamment des troubles du système nerveux caractérisés par une neuropathie périphérique et des troubles cognitifs. Ces dysfonctionnements neurologiques sont fréquents et retentissent sur la qualité de vie des patientes, aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, les symptômes invalidants provoqués par les troubles neurologiques chimio-induits et la difficulté de leur prise en charge entraînent des conséquences socio-économiques graves, et une souffrance importante pour les patientes et leur entourage. En effet, étant donné l'absence de thérapeutiques neuroprotectrices efficaces, l'apparition et/ou la sévérité de ces troubles neurologiques peut contraindre à modifier voire arrêter le traitement antitumoral. Ainsi, en plus d'affecter la survie des patientes, la modification ou l'arrêt du traitement les prive, de fait, du bénéfice du protocole de chimiothérapie optimal permettant une chirurgie conservatrice. Il est donc d'une importance primordiale de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter

efficacement contre ces troubles neurologiques qui constituent un véritable problème de santé publique.

Pour élaborer et tester de nouvelles stratégies neuroprotectrices, l'utilisation de modèles animaux précliniques est indispensable. Malheureusement, à l'heure actuelle aucun modèle animal mimant les troubles neurologiques induits par la CNA qui est un standard dans le traitement du cancer du sein, n'a été établi. Cette absence de modèle préclinique pertinent limite ainsi le développement de thérapeutiques spécifiques et efficaces.

L'analyse des éléments contextuels et bibliographiques cités dans la partie introductive nous a permis de définir dans le cadre de cette thèse deux principaux objectifs schématisés sur la figure 10 :

(i) Le premier objectif a été de générer et de caractériser par une approche multidisciplinaire un modèle animal reproduisant de façon pertinente les symptômes périphériques et centraux induits par la CNA « Taxotère séquentiel », combinant les traitements EPI et DO (CNA-[EPI-DO]).

(ii) Le deuxième objectif a été d'utiliser le modèle animal généré pour évaluer le potentiel et/ou l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les symptômes neurologiques évoqués par la CNA-[EPI-DO].

Parmi les stratégies thérapeutiques potentielles, la DU est actuellement utilisée et recommandée pour la prise en charge des NPCI compte tenu de ses effets analgésiants et aléatoirement neuroprotecteurs. Malheureusement, l'utilisation de la DU s'avère inefficace et/ou inadaptée dans de nombreuses situations à cause des raisons suivantes :

- Le traitement par la DU n'est pas spécifique dans la prise en charge des NPCI
- La DU exerce des effets neuroprotecteurs très modestes, partiels et aléatoires ne permettant pas d'éradiquer les symptômes neurologiques

- Les actions bénéfiques de la DU s'accompagnent d'effets délétères importants qui conduisent souvent à l'arrêt du traitement chez au moins 25 % des patients.

Certaines observations décrites dans notre chapitre introductif (voir V.2.3) indiquent que la DU exerce une action bénéfique sur la cognition chez les patients dépressifs. Ces données suggèrent que la DU pourrait être un bon candidat/médicament à tester contre les troubles cognitifs évoqués par la CNA ou dans le syndrome du *chemobrain*. Toutefois, ce test n'a jamais été réalisé.

A l'appui des éléments rappelés ci-dessus, nous avons donc décidé de réaliser les deux évaluations suivantes dans le cadre de ce travail de thèse :

- ✓ Evaluation des effets bénéfiques potentiels de la DU à différentes doses (1,2, 4 et 8 mg/kg) dans le traitement des troubles cognitifs induits par la CNA-[EPI-DO].
- ✓ Evaluation d'une stratégie combinatoire entre la DU et un autre neuroprotecteur pour lutter contre les NPCI évoquées par la CNA-[EPI-DO]. Cette stratégie combinatoire repose sur l'amélioration de l'efficacité de la DU, pour obtenir un effet bénéfique complet à faible dose, tout en limitant ses effets secondaires. Parmi les familles de molécules potentiellement actives, l'AP fait l'objet d'une attention particulière. L'AP étant une molécule de référence majeure dans le domaine de la neuroprotection, nous avons choisi de l'utiliser dans un premier temps comme référence pour poser les bases d'une étude évaluant l'efficacité d'un traitement concomitant avec la DU dans la lutte contre les NPCI. Si cette stratégie combinatoire s'avère performante, elle constituera un support référentiel qui nous aidera à développer ultérieurement des stratégies neuroprotectrices plus sécurisées en utilisant des analogues de l'AP dépourvus d'action prolifératrice pour traiter les troubles neurologiques évoqués par la CNA ou par les chimiothérapies en général.

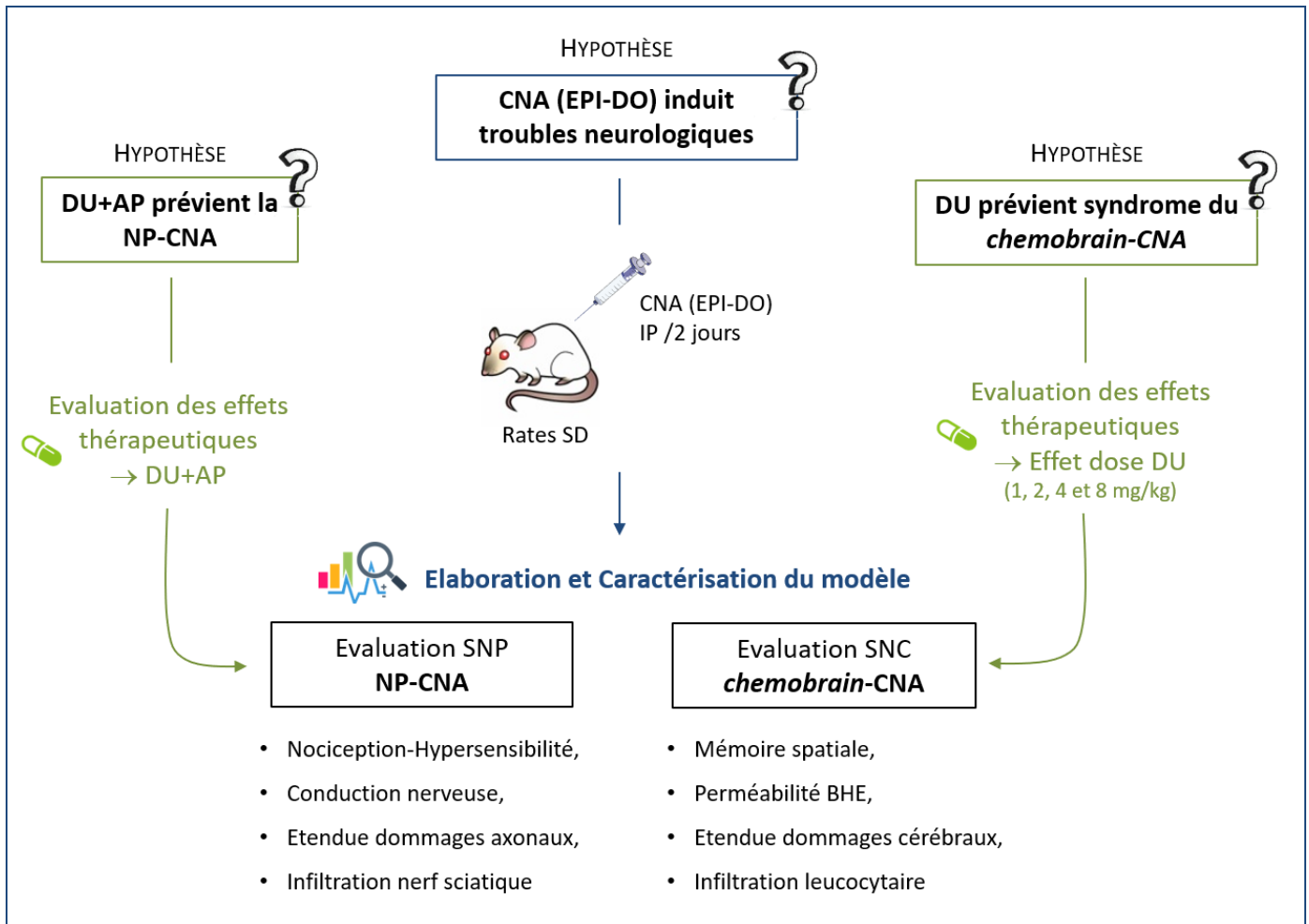


Figure 10 : Conceptualisation du projet et des objectifs

Le premier objectif est de générer et de caractériser un modèle murin (rates Sprague Dawley ou SD) de troubles neurologiques induits par la CNA-[EPI-DO] utilisé comme standard dans le traitement du cancer du sein (encadré bleu). L'étude multidisciplinaire (comportementale, électrophysiologique et histopathologique) permet d'évaluer les différents paramètres caractéristiques des atteintes périphériques (neuropathie périphérique) et centraux (chemobrain) induits par la CNA-[EPI-DO].

La caractérisation de ce modèle généré permet ensuite d'évaluer le potentiel et/ou l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les symptômes évoqués par la CNA-[EPI-DO] (encadrés verts) : les effets bénéfiques potentiels de la combinaison concomitante de duloxétine (DU) et d'alloprégnanolone (AP) (stratégie combinatoire DUAP) contre la NP-CNA, et ceux de différentes doses de DU pour prévenir l'apparition des atteintes centrales seront évalués. Ces études reprennent l'évaluation des paramètres analysés lors de la caractérisation du modèle par l'utilisation des mêmes techniques expérimentales.



MATERIELS ET METHODES

I/ Animaux, conditions d'hébergements et déclarations éthiques

Pour les différentes expériences nous avons utilisé des rates Sprague-Dawley adultes, pesant entre 175 et 200g et âgées de 6 semaines à leur arrivée dans l'animalerie. En prévision d'évaluer à long terme les effets observés durant ces travaux chez un modèle de cancer mammaire chez le rat, nous avons opté pour l'utilisation de femelles. Les animaux ont été obtenus à partir d'une source commerciale (Janvier, Le Genest St Isle, France) et logés, deux par cage, dans des conditions de laboratoire standard dans un cycle d'alternance lumière/obscurité de 12/12 heures, avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Afin de minimiser le stress et l'anxiété, les animaux ont eu une période d'acclimatation d'une semaine avant le début des expériences, durant laquelle les animaux ont été également habitués à la manipulation et à la présence de l'expérimentateur. Les soins et les manipulations des animaux ont été réalisés conformément aux directives du Conseil de la Communauté européenne (86/609/CE) et sous la supervision d'enquêteurs autorisés. Toutes les expériences ont été réalisées en minimisant le nombre d'animaux utilisés ainsi que leurs souffrances, conformément au Guide du ministère de la Santé publique vétérinaire d'Alsace pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (numéro 67-186) et en suivant les lignes directrices éthiques de l'Association internationale pour l'étude de la douleur. Le numéro de saisine couvrant l'ensemble des expérimentations a été le suivant : APAFIS#9373-201605111128746 v2.

II/ Drogues et solubilisation

- **Epirubicine** (EPI ; Carbosynth Limited, UK)

EPI est une anthracycline, 4'-épi-isomère de l'antibiotique antinéoplasique doxorubicine. Cette drogue s'intercale dans l'ADN et forme un complexe inhibant la topoisomérase II. En plus d'inhiber la réplication de l'ADN, ce complexe conduit à sa fragmentation (figure 11).

Le chlorhydrate d'EPI a été dissous dans une solution saline 30 minutes à 30°C, stocké à 4°C et protégé de la lumière. La solution saline a été utilisée pour le groupe véhicule. L'EPI a été administrée par voie intra-péritonéale tous les deux jours pendant une semaine (4 injections) à une dose de 1 mg/kg/injection.

- **Docétaxel** (DO ; Carbosynth Limited, UK)

Le DO est un taxane semi-synthétique appartenant à la famille des poisons du fuseau mitotique qui exerce ses effets anticancéreux via la stabilisation des microtubules (figure 11). En stabilisant la polymérisation des dimères de tubuline, le DO conduit ainsi à l'arrêt de la division mitotique dans la phase G2/M du cycle cellulaire et à la mort cellulaire par apoptose. En clinique, la forme posologique intraveineuse du DO disponible dans le commerce est formulée dans un tensioactif non ionique, le polysorbate 80 (ou Tween 80®), et dans de l'éthanol pour finalement être dilué dans du liquide de perfusion. Ce mélange doit être utilisé dans les 4 heures suivants sa conception en raison de son instabilité entre 2 et 25 ° C.

Ici, le DO a été dissous dans un mélange d'éthanol-Tween80 (50%/50%) à une concentration de 20 mg/ml. Juste avant l'administration à l'animal, ce mélange a été dilué 10 fois avec une solution aqueuse contenant 5% de glucose (mélange final éthanol/Tween80/eau glucosée : 5%/5%/90%) pour obtenir une dose de 2 mg/mL. Les rats témoins ont été injectés avec le mélange éthanol-Tween80-eau glucosée 5% (5%/5%/90%). Le DO a été administré par voie intra-péritonéale tous les deux jours pendant deux semaines (8 injections) à une dose de 2 mg/kg/injection.

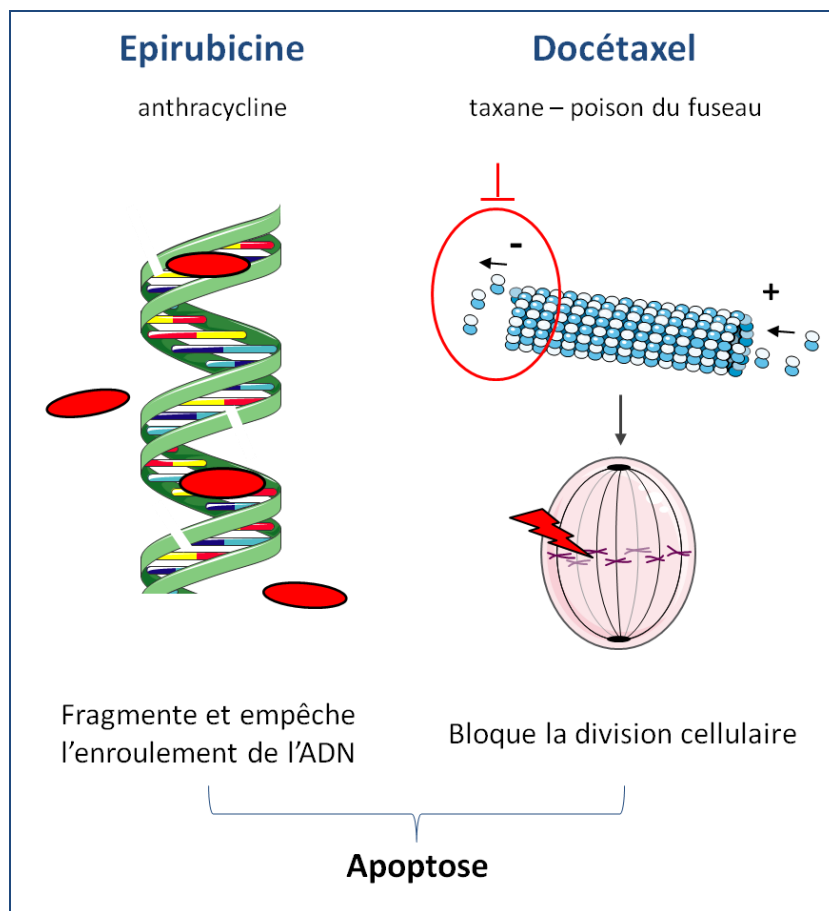


Figure 11 : Mécanisme d'action de l'épirubicine et du docétaxel

L'épirubicine et le docétaxel sont des agents cytotoxiques utilisés comme traitement chimiothérapique pour leur capacité à former des complexes avec l'ADN (épirubicine) ou à stabiliser la polymérisation de la tubuline (docétaxel), conduisant à l'arrêt de la division cellulaire et à la mort des cellules cancéreuses.

- **Duloxétine** (DU, Carbosynth Limited, Royaume-Uni)

DU est un antidépresseur inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. DU a été diluée dans de l'hydroxypropylcellulose ou HPC 0,3% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dans de l'eau, qui a été utilisé comme véhicule. En traitement des neuropathies chimio-induite chez les patients, la DU est administrée chaque jour à 60 mg (Smith, Pang et al. 2013, Lunn,

Hughes et al. 2014, Pachman, Watson et al. 2014), correspondant environ à une dose de 1mg/kg/jour. Basé sur ce fait, dans l'étude du potentiel thérapeutique de la DU contre la neuropathie périphérique évoquée par la CNA, nous avons utilisé DU à une dose de 2mg/kg/2 jours. Pour évaluer les effets neuroprotecteurs potentiels au niveau du SNC (cognition/mémoire), nous avons testé différentes doses de DU, à savoir 1, 2, 4 et 8 mg/kg/2 jours. La DU a été administrée par voie intra-péritonéale tous les deux jours pendant 4 semaines (15 injections).

- **Allopregnanolone** (AP, Carbosynth Limited, Royaume-Uni)

L'AP est un neurostéroïde neuroactif métabolite de la progestérone. AP a été dilué dans de l'hydroxypropylcellulose ou HPC 0,3% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dans de l'eau, qui a été utilisé comme véhicule. AP à 4 mg/kg/2jours apparait comme étant la dose efficace et optimale pour traiter les symptômes neuropathiques dans des modèles animaux de neuropathie évoquée par la vincristine et l'oxaliplatine (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011). Basé sur ces précédents résultats, nous avons donc utilisé dans cette étude l'AP à une dose de 4 mg/kg/2jours. L'AP a été administré par voie intra-péritonéale tous les deux jours pendant 4 semaines (15 injections).

III/ Traitement animal

III.1. Démarche expérimentale des tests comportementaux

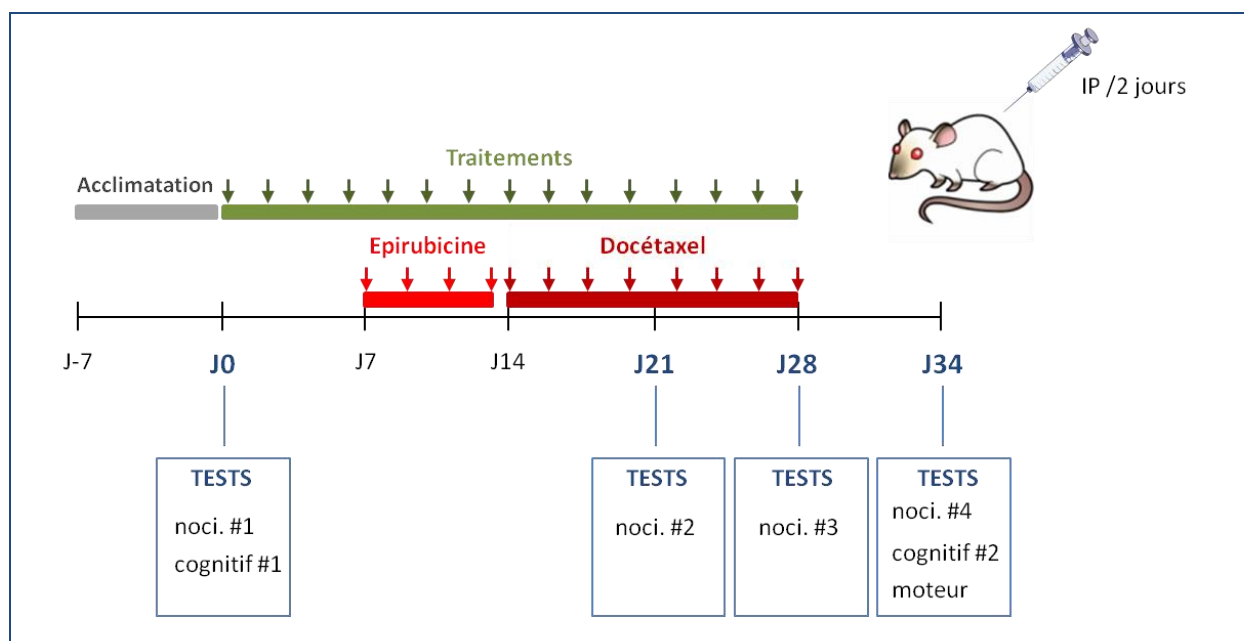


Figure 12 : Protocole expérimental général avec stratégie thérapeutique préventive

Après une semaine d'acclimatation pour les rates, les traitements (selon les groupes d'animaux) ont été administrés durant les 4 premières semaines (J0 à J28). Le traitement de chimiothérapie néo-adjuvante s'est effectué sur 3 semaines à partir de J7, avec 4 injections d'épirubicine à 1mg/kg/injection la première semaine, suivie de 8 injections de docétaxel à 2mg/kg/injection les deux semaines suivantes (J14 à J28). Afin de voir l'évolution des altérations sensorielles périphériques, les tests nociceptifs (filament de von Frey et test de la goutte d'acétone / noci.) ont été régulièrement réalisés, comme indiqué sur le schéma, à J0 (noci. #1), à J21 (noci. #2), J28 (noci. #3) et J34 (noci. #4). L'évaluation des capacités mnésiques par le test du « spatial object recognition » a été faite pré- et post-traitement (J0 et J34, cognitif #1 et cognitif #2 respectivement). Enfin, l'évaluation des capacités locomotrices à la suite des traitements a été effectuée par le test du Catwalk à J34. Les prélèvements ainsi que les analyses électrophysiologiques ont été effectués à J34.

Tableau 13 : Cohortes utilisées pour réaliser les différentes études

Etude	Cohorte	Tests comportementaux	Analyses biochimiques et neurophysiologiques	Groupes expérimentaux (effectif)
Caractérisation du modèle + Evaluation des traitements thérapeutiques potentiels	A	Nociceptifs [Cognitif-objets centraux]	<u>Nerf sciatique</u> : NF200 GFAP CD11b/c Eléctrophysiologie	veh-veh (6) c-veh (6) c-DU (6) c-AP (6) c-DUAP (6)
	B	Cognitif - objets périphériques Moteurs	<u>Encéphale</u> : GFAP Ki67 NG2 CD45 <u>Frottis vaginaux</u>	veh-veh (6) c-veh (6) c-DU2 (6) c-DU4 (6) c-DU8 (6)
	C	Cognitif – objets périphériques Moteur	<u>Encéphale</u> : GFAP Ki67 NG2 CD45 <u>Sang intra-cardiaque</u> : Dosage cytokines <u>Frottis vaginaux</u>	veh-veh (6) veh-DU4 (6) c-veh (6) c-DU1 (6) c-DU2 (6) c-DU4 (6)
Choix des distances pour le test cognitif	D	Cognitif – objets centraux	/	Naïves (5)
Evaluation de la perméabilité de la BHE	E	/	Test du colorant bleu Evans	veh (3) CNA (5)

La figure 12 illustre le protocole expérimental des injections et des tests comportementaux effectués. Le tableau 13 reprend toutes les cohortes utilisées pour effectuer les différentes études. Après l'arrivée des animaux dans l'animalerie centrale, nous avons laissé une semaine d'acclimatation pour les rats, durant laquelle des sessions d'habituation à l'expérimentateur et à la manipulation ont été effectuées. Avant le début du traitement au jour 0 (J0), les tests nociceptifs et cognitifs de condition basale (tests #1) ont été réalisés. Ces tests en condition basale ont permis de constituer des groupes d'animaux de sensibilité et de performance mnésique homogène. Dans le but d'évaluer le potentiel neuroprotecteur de la combinaison DUAP comparée à la DU et à l'AP seule pour lutter contre les altérations liées à la neuropathie périphérique, 5 groupes ont été constitués, à savoir le groupe véhicule-véhicule (veh-veh), le groupe chimio-véhicule (c-veh), le groupe chimio-Duloxétine à 2mg/kg/injection (c-DU), le groupe chimio-allopregnanolone à 4 mg/kg/injection (c-AP) et le groupe chimio-Duloxétine+AP à 2 et 4 mg/kg/injection respectivement (c-DUAP). Nous avons également évalué le potentiel neuroprotecteur sur les atteintes centrales de la DU à différentes concentrations. Pour ce travail, nous avons constitué 6 groupes d'animaux : véhicule-véhicule (veh-veh), véhicule-Duloxétine à 4mg/kg/injection (veh-DU4), chimio-véhicule (c-veh), chimio-Duloxétine à 1mg/kg/injection (c-DU1), chimio-Duloxétine 2mg/kg (c-DU2), chimio-Duloxétine à 4mg/kg/injection (c-DU4) et chimio-Duloxétine 8mg/kg (c-DU8).

Pour établir une cinétique d'installation des symptômes neuropathiques, les tests comportementaux ont été réalisés à J21 (noci #2), J28 (noci #3), et une semaine après l'arrêt de tous traitements (noci #4 ; cognitif #2 et moteur).

Pour éviter les biais liés à l'éventuel stress et à l'effet aigue potentiel des drogues, les injections sont effectuées après les tests comportementaux. Enfin, les animaux ont été suivis et pesés quotidiennement tout au long de l'expérimentation.

III.2. Démarche expérimentale des injections

III.2.1. Traitements thérapeutiques potentiels :

Les différents traitements testés en stratégie préventive ont débuté une semaine avant la chimiothérapie, immédiatement après les premiers tests nociceptifs et cognitifs en condition basale (#1, J0) (Figure 12). Ils se poursuivent jusqu'à la fin de la période d'administration de la chimiothérapie (J28). Ainsi, les animaux ont été injectés par voie ip tous les deux jours pendant 4 semaines. Les traitements ont donc été effectués à J0, J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14, J16, J18, J20, J22, J24, J26 et J28. Selon le traitement administré, les animaux ont reçu une dose cumulée d'AP de 60mg/kg, et/ou 15, 30, 60 ou 120mg/kg de duloxétine. Les rats témoins ont été injectés avec le véhicule (1 mL/kg) selon un schéma similaire.

III.2.2 Chimiothérapie :

La chimiothérapie a été administrée pendant 3 semaines à partir de J7, soit une semaine après le début des traitements préventifs contre la NPCI. Les animaux ont été séquentiellement traités par EPI et DO par voie ip tous les deux jours pendant la première et les deux semaines suivantes respectivement. EPI a donc été donnée à J7, J9, J11 et J13 et DO à J14, J16, J18, J20, J22, J24, J26 et J28. Les animaux ont reçu une dose séquentielle cumulée de 4 mg/kg et 16 mg/kg d'EPI et de DO respectivement. Les rats témoins ont été injectés avec le véhicule (1 mL/kg) de la même façon.

IV/ Analyses comportementales

L'ordre de passage des animaux a été conservé d'un jour de test comportemental à l'autre. Chaque dispositif a été nettoyé à l'éthanol 70% entre chaque animal, et nettoyé à grande eau-savon plus alcool à la fin de chaque expérience. Dans l'optique de minimiser l'anxiété, les animaux ont été habitués aux différents dispositifs la veille des tests à J0. De

même, les animaux sont placés dans leur cage de stabulation dans la pièce des tests comportementaux au moins 30 minutes avant le début de chaque test.

IV.1. Evaluation de la sensibilité nociceptive par des tests nociceptifs

La douleur neuropathique résulte d'une lésion ou d'une modification pathologique du système nerveux somatosensoriel, conduisant à un mode de fonctionnement anormal ou inadapté. Les patients peuvent ainsi présenter des douleurs spontanées continues et/ou des paresthésies (picotements, piqûres, engourdissements), auxquels peuvent s'ajouter des douleurs de type hyperalgie (un stimulus nociceptif perçu de manière plus intense qu'à l'ordinaire) et de l'allodynie (un contact physique non douloureux pouvant le devenir). Pour évaluer la sensibilité mécanique et thermique au froid, nous avons utilisé le test des filaments de von Frey ainsi que le test de la goutte à l'acétone respectivement.

IV.1.1. Sensibilité mécanique : Test des filaments de von Frey

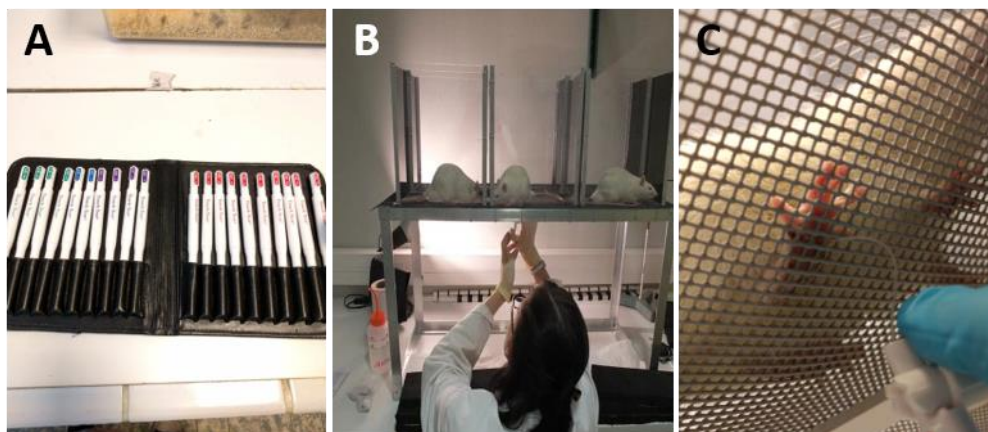


Figure 13 : Test comportemental des filaments de von Frey

Le rat est placé dans une enceinte surélevée au sol grillagé. Après 10 minutes d'acclimatation, les filaments de von Frey (A) sont appliqués 5 fois chacun sur la face plantaire des deux pattes arrière de l'animal, lorsqu'il est calme et immobile (B). Les filaments sont appliqués jusqu'à obtenir la courbure du filament (C) et le pourcentage de réponse est ensuite calculé.

PRINCIPE

Les filaments de von Frey sont des outils de diagnostic, de recherche et de dépistage utilisés à la fois en clinique humaine et animale, et sont des outils importants pour l'étude des mécanismes de l'entrée sensorielle induite par la stimulation cutanée (Chaplan et al. 1994, Pitcher et al. 1999, Deuis et al. 2017). Son utilisation évalue la sensibilité mécanique par l'application de filaments de même longueur mais de diamètre varié. Par conséquent, les filaments, de calibres différents, permettent d'appliquer une gamme de force (typiquement de 0,008 g jusqu'à 300 g de force) dans le champ réceptif cutané. La stimulation mécanique est réalisée lorsque l'extrémité du filament de diamètre donné est appliquée, chez l'animal, contre la surface plantaire arrière à angle droit. La force d'application augmente tant que l'expérimentateur poursuit le mouvement de pression, jusqu'à ce que le filament fléchisse (figure 13C). Après la flexion du filament, la poursuite du mouvement de pression augmente la flexion mais pas la force d'application. Ce principe permet à l'expérimentateur d'appliquer sur la surface de la peau, à la main, une force reproductible. L'application de filaments est faite pour provoquer une réponse de retrait de la patte arrière en cas de douleur et permet donc d'établir le nombre de réponse de retrait de la patte. L'évolution du comportement douloureux et notamment le développement et le maintien d'une allodynie et/ou d'une hyperalgie mécanique statique peut alors être suivie. À ce jour, le treillis métallique est l'appareil couramment utilisé pour permettre leur application chez l'animal (figure 13B). Plus précisément, le rat testé est placé sur un plancher surélevé, tandis que les filaments sont appliqués par le bas, à travers la maille du plancher grillagé, sur la surface plantaire de la patte (Figure 13B et C).

APPROCHE EXPERIMENTALE

L'animal est placé dans une enceinte en acrylique surélevée au sol grillagé (L32xI22xH34 cm). Après 10 minutes d'habituation dans l'enceinte, l'animal a fini d'explorer

les locaux et se tient tranquille dans une quasi-immobilité, ce qui permet de commencer l'expérience. Le test consiste en l'application des filaments de 4, 10, 15, et 26 g sur la surface plantaire des pattes arrière de l'animal. Chaque filament est appliqué 5 fois par patte et de façon alternative droite-gauche. La réponse de l'animal à chaque stimulation est quantifiée selon la règle suivante : 0, absence de réponse à l'application du filament ; 1, retrait de la patte stimulée avec éventuellement fuite ou attaque du filament et/ou toilettage asymétrique dirigé vers la région stimulée, correspondant à une réponse comportementale douloureuse. Chaque score est rapporté manuellement sur une grille portant le numéro de l'animal ainsi que la date. On calcule ensuite un pourcentage de réponse sur les 5 scores obtenus pour chaque filament. Il est à noter qu'un pourcentage de réponse $\geq 80\%$ sonne l'arrêt du test pour l'animal concerné (point limite). Usuellement, le test des filaments de von Frey sert à évaluer le symptôme d'allodynie mécanique (4 g) mais aussi l'hyperalgie mécanique (15 g ; 26 g). Ainsi, les données obtenues permettent d'objectiver les symptômes d'allodynie et d'hyperalgie mécanique. Les animaux sont testés à J0 avant toute injection (condition basale) ce qui permet également de constituer des groupes de rats de sensibilités homogènes, puis à J14 (avant injection de chimiothérapie), J21, J28 et J34.

IV.1.2 Sensibilité thermique au froid : Test de la goutte à l'acétone



Figure 14 : Test comportemental de la goutte d'acétone

Pour évaluer la sensibilité nociceptive thermique au froid, le rat est placé dans une enceinte surélevée au sol grillagé. Une goutte d'acétone est déposée, à l'aide d'une seringue Hamilton disposant d'un cathéter (A), au niveau de la patte arrière de l'animal pour cibler la surface plantaire (B). L'évaporation de la goutte d'acétone au contact de l'animal produit alors un stimulus froid. Le temps de latence de retrait de la patte est enregistré dans une période de 20 secondes.

PRINCIPE

Un modèle commun pour tester et évaluer la sensibilité au froid, et plus particulièrement l'allodynie thermique, est le test d'évaporation de l'acétone. Cette méthode couramment utilisée se base sur les propriétés de l'acétone à devenir froid lors de son évaporation au contact de la peau (Choi et al. 1994, Sandkuhler 2009, Brenner et al. 2012).

APPROCHE EXPERIMENTALE

Dans notre cas, nous réalisons le test de l'acétone à la suite du test des filaments de von Frey. Les six animaux sont placés dans le même dispositif utilisé pour le test des filaments de von Frey. Après un délai d'habituation au dispositif de 10 minutes, le test débute. A l'aide d'une seringue Hamilton sur laquelle est placé un cathéter, on dépose 50µl d'acétone pur sur le côté de la patte arrière de l'animal (figure 14A), avec comme objectif de cibler la surface plantaire du rongeur (figure 14B). Il est à noter que l'on évite de toucher l'animal pour ne pas induire de biais via une stimulation mécanique de la zone. A la suite du dépôt de la goutte d'acétone, on déclenche immédiatement un chronomètre et on observe la réponse de l'animal pendant une période de 20 secondes. Une réponse est considérée comme positive lorsque la stimulation thermique induit le retrait de la patte accompagné de secousses, avec éventuellement toilettage asymétrique dirigé vers cette région. Sur la feuille de résultats, on reporte le temps de latence jusqu'à observer un retrait de la patte et/ou un léchage pour chaque animal et pour chaque patte. On répète 3 mesures pour chaque patte arrière, ce qui nous fait 6 mesures par animal au total, et nous permet de calculer un pourcentage de réponse.

IV.2. Evaluation de la mémoire spatiale par le test du *spatial object recognition*

CHOIX DU TEST COGNITIF

Chez les patientes, on observe des déficits cognitifs objectivés par des tests neuropsychologiques. En plus de toucher les fonctions exécutives et les processus

attentionnels, ces déficits chimio-induits concernent en particulier des dysfonctionnements de la mémoire épisodique et de la mémoire de travail. Etant donné le spectre des déficits neurocognitifs chez les patientes, il a été proposé que la toxicité de l'hippocampe - structure jouant un rôle clef dans la formation de la mémoire, de l'apprentissage et dans les processus spatiaux - induit par la chimiothérapie, est un important médiateur de ce syndrome (Dietrich, Prust et al. 2015). De plus, les techniques de neuro-imagerie cérébrale montrent une diminution du volume de l'hippocampe chez les patientes, mais également une diminution de son activation lors de tâche mnésique, en lien avec les déficits faisant suite à la chimiothérapie (Dietrich, Prust et al. 2015, Orchard, Gaudier-Diaz et al. 2017).

Pour évaluer les capacités mnésiques dans notre modèle d'étude, nous avons donc choisi et utilisé un test cognitif directement lié à l'intégrité de l'hippocampe. Le *Spatial object recognition* est une version modifiée de l'*object recognition task* qui permet de tester, cette fois-ci, la mémoire spatiale chez les rongeurs (Barker et al. 2007). Cette tâche évalue l'habileté du rat à reconnaître un déplacement d'objet familier, et donc une certaine configuration spatiale, dans un environnement connu. Répondant à la question « où ? », ce test, communément associé avec les mesures de la mémoire épisodique hippocampique, permet donc l'étude de la mémoire hippocampo-dépendante chez le rongeur (Tuscher, Szinte et al. 2016).

Basé sur la tendance naturelle et la préférence spontanée des rongeurs à la nouveauté et à l'exploration d'un nouveau stimulus (Ennaceur et al. 1997), ce test offre plusieurs avantages. En effet, il ne nécessite pas d'entraînement (contrairement à la piscine de Morris, par exemple), et n'exige pas de punition ou de renforçateurs qui pourraient influencer la composante motivationnelle. Enfin, il ne demande ni de restriction nutritive, de choc électrique ou bien de submersion dans l'eau. Hormis le stress lié à l'enceinte ouverte que

constitue le dispositif, ce test est considéré comme moins anxiogène pour l'animal en comparaison à d'autres (Tuscher, Szinte et al. 2016).

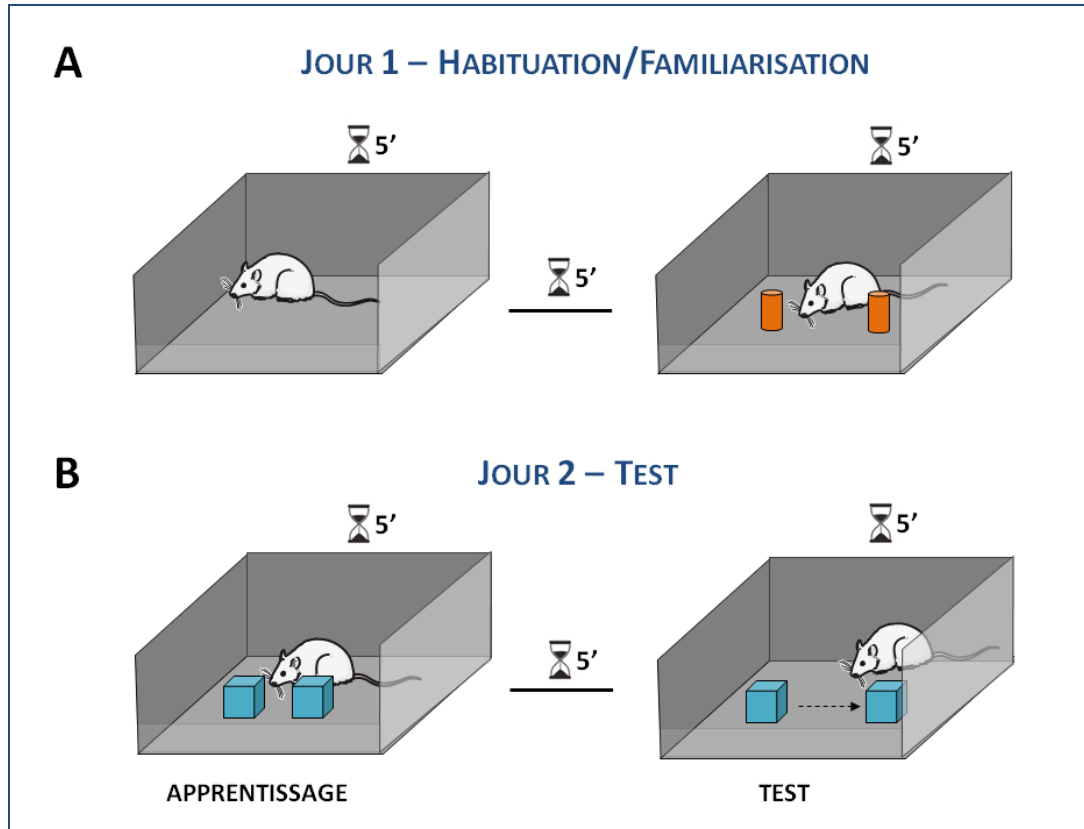


Figure 15 : Protocole expérimental du test de l'objet spatial recognition

Ce test permettant d'évaluer la mémoire spatiale chez le rongeur se compose de deux phases. Au jour 1 (A), correspondant à la phase d'habituation et de familiarisation, l'animal est libre d'explorer pendant une durée de 5 minutes le dispositif expérimental (enceinte en champ ouvert) vide puis dans lequel se situent deux objets identiques. Le lendemain (B), on procède au jour de test, décomposé en une étape d'apprentissage où l'animal explore et encode une certaine configuration spatiale, puis après un délai de 5 minutes l'étape de test dans laquelle un des deux objets est déplacé d'une certaine distance définie. Le temps d'exploration pour chaque objet et dans chaque phase est enregistré grâce au système de video tracking Any-maze.

PRINCIPE ET APPROCHE EXPERIMENTALE

Pour effectuer ce test, nous nous sommes basé et inspiré du protocole expérimental de Cès (Ces, Burg et al. 2018), également utilisé par van Hagen (van Hagen, van Goethem et al. 2015). Ce test se compose de trois étapes réparties sur deux jours consécutifs : une phase

d'habituation au premier jour (figure 15A), puis le lendemain une phase d'échantillonnage suivie par la phase de test (figure 15B).

- **Jour 1**

L'habituation permet de familiariser l'animal avec l'enceinte ouverte, afin qu'elle devienne un environnement connu, et de l'habituer à la présence d'objets dans cet environnement. Pour cela l'animal est placé, la veille du jour d'apprentissage et de test, dans l'enceinte vide d'objets puis, après un délai de 5 minutes dans sa cage, avec deux objets identiques où l'animal est libre d'exploration pendant 5 minutes.

- **Jour 2**

Le jour suivant, pendant la phase d'apprentissage ou dite d'échantillonnage, une nouvelle paire d'objets est placée distancés de 30cm l'un de l'autre dans l'enceinte. L'animal est libre d'explorer cet environnement pendant 5 minutes. Après un délai de 5 autres minutes dans sa cage, l'animal est replacé dans l'enceinte où un des deux objets a été déplacé d'une certaine distance (20 cm, soit une distance de 50 cm entre les deux objets puis 30 cm, soit une distance de 60 cm entre les objets). Le temps d'exploration est enregistré et mesuré pour chaque objet. Le temps d'exploration est défini comme étant l'orientation du museau de l'animal à moins de deux centimètres de l'objet, que l'animal renifle ou touche l'objet. Cependant, le fait de courir autour de l'objet, d'être assis ou de monter sur l'objet n'a pas été considéré et enregistré comme étant de l'exploration.

CALCUL DE L'INDEX

L'enregistrement des différents temps d'exploration pendant la phase d'échantillonnage et la phase de test permet de calculer un index relatif de discrimination.

Les temps d'exploration en phase d'échantillonnage de l'objet fixe (t_1) et de l'objet à déplacer (t_2) sont enregistrés et permettent de calculer l'indice de discrimination (I_1) corrigée par l'activité exploratoire : $I_1 = (t_2 - t_1) / (t_1 + t_2)$

Il est à noter qu'ici, l'animal ne devrait pas présenter de préférence pour l'un des deux objets et donc explorer ces objets de façon identique. On obtient donc un indice de discrimination autour de la valeur nulle.

De la même façon, les temps d'exploration en phase de test de l'objet fixe (t_3) et de l'objet déplacé (t_4) permettent de la même manière de calculer l'indice de discrimination (I_2) corrigé par l'activité exploratoire : $I_2 = (t_4 - t_3) / (t_3 + t_4)$

Dans un souci d'éventuelle différence d'exploration entre les deux objets durant la phase d'échantillonnage, qui pourrait refléter une préférence pour l'une des deux positions, nous avons corrigé l'indice obtenu lors de la phase de test (I_2) par l'indice de la phase d'échantillonnage (I_1) :

$$\text{INDEX} = I_2 - I_1$$

On obtient donc un index de discrimination relatif pouvant aller de -1 à +1. Un index de -1 ou +1 indique une préférence complète pour l'objet en position fixe ou le nouvel emplacement respectivement, et un index de 0 signifie qu'il n'y a aucune préférence. Classiquement un rat passe plus de temps à explorer l'objet déplacé s'il se souvient de la place familière, ce qui reflète l'utilisation de processus d'encodage et de mémorisation. On considère que la mémoire spatiale est intacte quand l'animal passe significativement plus de temps sur l'objet déplacé durant la phase de test.

IV.3. Evaluation des capacités motrices par le test du Catwalk

Les effets potentiels de la CNA dans cette étude sur la locomotion sont importants à caractériser. En effet, si les capacités locomotrices sont affectées, il existe de potentielles interactions avec d'autres mesures comportementales destinées à évaluer les fonctions cognitives, particulièrement dans des tâches d'exploration et/ou de navigation spatiale. En outre, cette caractérisation locomotrice permet de vérifier l'existence de biais sensorimoteurs pouvant affecter les résultats obtenus dans les autres tests comportementaux. Pour cette caractérisation locomotrice, nous avons utilisé la méthode du Catwalk.

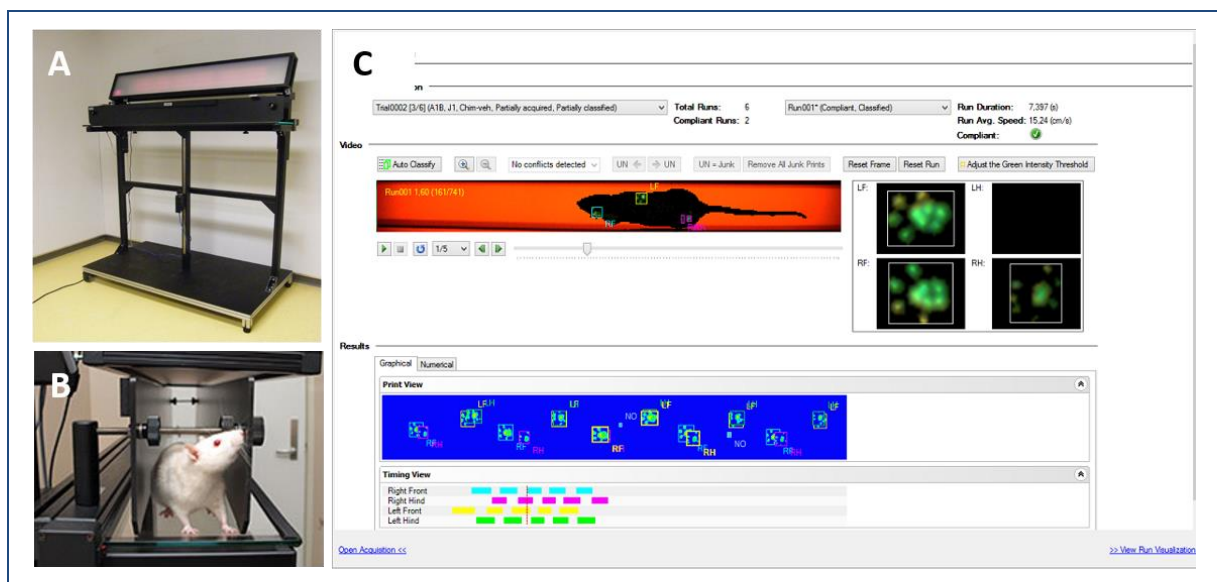


Figure 16 : Test comportemental du Catwalk

(A) Présentation du dispositif du Catwalk et (B) exemple d'un rat à la sortie de la passerelle. En (C) une impression écran de l'analyse de la marche dans le logiciel du Catwalk.

PRINCIPE

La méthode du Catwalk, qui mesure un grand nombre de paramètres de marche statique et dynamique, est un système complet d'évaluation quantitative des pas et des performances motrices chez les rongeurs. Les impressions réelles des pas sont mesurées avec précision et permettent d'obtenir des données fiables. Cette méthode d'analyse locomotrice

assistée par ordinateur permet la quantification rapide des paramètres individuels de la patte ainsi que des paramètres liés à la coordination motrice. L'appareil du CatWalk se compose d'une passerelle en verre éclairée par une lumière fluorescente (figure 16A et B). Lorsque la patte de l'animal est en contact avec la surface supérieure de la passerelle, l'empreinte lumineuse est réfléchiée vers le bas. Le système est équipé d'une caméra couleur haute vitesse connectée à un ordinateur avec le logiciel de détection CatwalkXT9.1 (figure 16C).

PROTOCOLE

L'animal traverse volontairement la passerelle en verre et ses empreintes de pas sont ainsi capturées. Pour valider une traversée, l'animal doit passer le couloir dans un délai compris entre 0,50 et 10 secondes, sans marquer d'arrêter ni se retourner dans le dispositif. Les rats ont d'abord été habitués à l'appareil et entraînés la veille du jour du test locomoteur, en traversant au minimum trois fois le couloir sans enregistrement. Ce test locomoteur a été réalisé une fois par animal, à raison de 3 passages consécutifs, en fin d'expérimentation (J34). La passerelle a été fixée à 9,5 cm de large. La caméra était positionnée à 96 cm sous la passerelle et les paramètres de détection automatique ont été appliqués. Un seuil d'intensité a été réglé à 0,10 et le gain de la caméra a été réglé à 20.

PARAMETRES ANALYSES

Paramètres liés aux pattes simples :

- Support de la marche (*base of support*) (moyenne, exprimé en cm) : Le support de la marche (ou base de soutien) est la distance entre les deux membres postérieurs ou antérieurs du rat (figure 17). Il est mesuré pour chaque cycle de pas et est une moyenne calculée par traversée de la passerelle. Ce paramètre est en lien avec les capacités d'équilibre de l'animal.

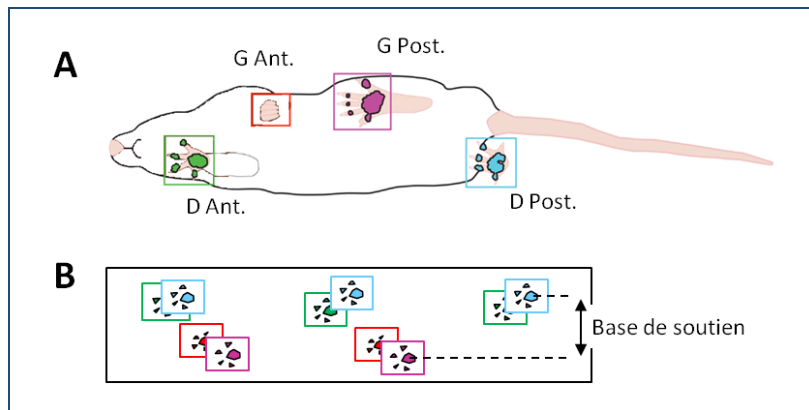


Figure 17 : Paramètre de support de la marche évalué par le test du Catwalk

(A) Les empreintes de pas des pattes antérieures gauche et droite (G Ant. et D Ant.), et des pattes postérieures gauche et droite (G Post. et D Post.) de l'animal (vue de dessous). L'enregistrement de ces empreintes par le système du Catwalk permet d'analyser de multiples paramètres, dont le support de la marche, ou encore appelé base de soutien, qui fait référence à la distance entre les deux pattes postérieures et antérieures (B).

- Intensité de l'empreinte de la patte (*mean intensity*) (exprimée en unités arbitraires) : Ce paramètre décrit la pression moyenne exercée par une patte individuelle pendant le contact avec le sol, pendant toute la traversée de la passerelle.

Paramètre lié à la coordination :

- Séquence de la marche ou indice de régularité (*regularity index*) (exprimé en %) : L'indice de régularité est une mesure de la coordination entre les membres en utilisant l'analyse des séquences d'étapes (Vrinten and Hamers 2003). L'index de régularité évalue le degré de coordination et représente le pourcentage de séquences d'étapes normales.

V/ Identification du stade du cycle œstral par coloration cytologique

Les hormones stéroïdes régulent des fonctions variées associées au système nerveux, incluant la régulation des systèmes de neurotransmissions, la connectivité synaptique, le branchement dendritique et la myélinisation. Ainsi, ils sont impliqués dans les émotions, l'humeur, les comportements sexuels et sociaux, mais également dans la cognition (Rossetti et al. 2016). Afin de vérifier la part du statut hormonal sur les performances mnésiques lors de nos tests, et d'éviter des interprétations biaisées par ce phénomène, il est important d'identifier le stade du cycle œstral où se situe chaque animal lors du test cognitif.

COLLECTION DES CELLULES VAGINALES

Pour collecter les cellules vaginales, nous avons appliqué la procédure de McLean (McLean et al. 2012). On agrippe la queue de l'animal pour élever son extrémité arrière. Dans le cas où l'animal urine, on attend que la miction s'arrête pour ensuite rincer l'ouverture à l'entrée du canal vaginal avec de l'eau distillée, en utilisant une pipette autre que la pipette de prélèvement. On place ensuite l'extrémité de la pipette pasteur remplie d'eau distillée à l'ouverture du canal, et on expulse doucement le quart voire la moitié du volume d'eau à l'ouverture du canal vaginal. Le liquide est aspiré spontanément dans le canal, sans insertion de la pointe. On relâche ensuite lentement la pression exercée sur l'ampoule pour que le liquide se retire dans la pointe. Cette opération est répétée 4-5 fois pour obtenir un nombre suffisant de cellules dans un seul échantillon. Le liquide est ensuite placé sur une lame de verre gélatinée, puis le frottis est laissé sécher complètement à température ambiante. Une fois secs, ces frottis sont immédiatement colorés.

COLORATION CYTOLOGIQUE EN UTILISANT LE VIOLET DE CRESYL

La lame sèche est placée dans un récipient de coloration contenant le colorant violet de cresyl 0,1% pendant 20 minutes. Après avoir rincé la lame avec de l'eau distillée pendant 2 x 1 seconde, l'excédent d'eau distillée sur les bords de la lame est enlevé avec un essuie-tout, en évitant tout contact avec le frottis. Le montage des lamelles est réalisé avec de l'eukitt® (eukitt® quick-hardening mounting medium, Sigma-aldrich, St Louis, MO). Les frottis ainsi colorés sont ensuite stockés à température ambiante.

ANALYSE

Le rapport relatif des types de cellules observées par microscopie optique dans les frottis est utilisé pour identifier le stade du cycle oestral de l'animal le jour de la collecte de l'échantillon (figure 21) (McLean, Valenzuela et al. 2012). Au cours du dioestrus qui dure environ 57h chez la rate, on retrouve surtout des leucocytes qui prédominent, même si on peut retrouver quelques rares cellules épithéliales. Pendant le pro-oestrus, qui dure 12h, les cellules sont presque exclusivement des amas de cellules épithéliales nucléées rondes et bien formées, avec la présence de quelques leucocytes. Au cours de l'oestrus (12h également), on retrouve des cellules épithéliales cornifiées présentes dans des grappes densément tassées. Enfin, au cours du metoestrus d'une durée de 21h, de petits leucocytes colorés de manière sombre prédominent.

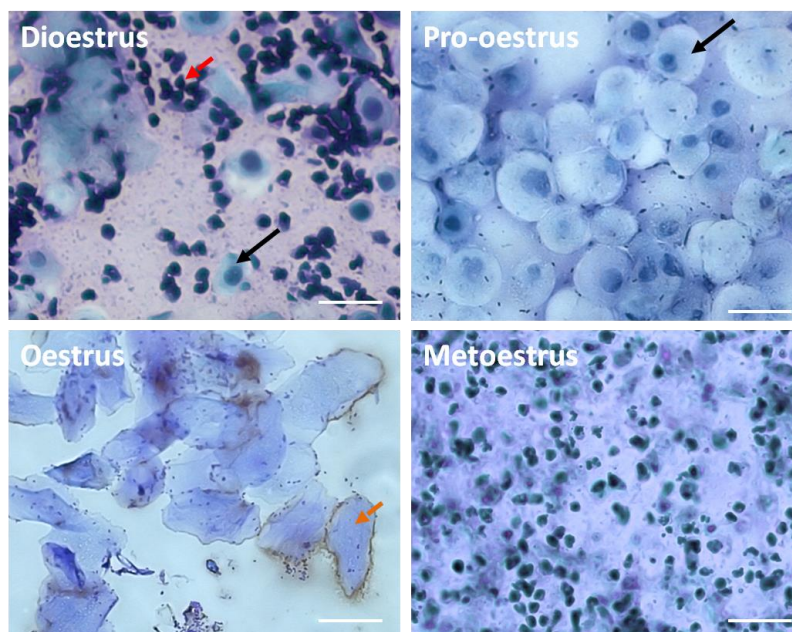


Figure 18 : Evaluation cytologique des frottis vaginaux pour identifier le stade du cycle oestral des rates.

Trois principaux types cellulaires sont détectés dans les échantillons de frottis vaginaux dont le rapport peut être utilisé pour identifier le dioestrus, le pro-œstrus, l'œstrus et le metoestrus. Les flèches noires pointent des cellules épithéliales nucléées, rondes et bien formées, qui sont présentes en grand nombre et en amas lors du pro-œstrus. La tête de la flèche rouge indique les leucocytes présents lors du dioestrus et prédominants dans le metoestrus. La flèche orange cible une cellule épithéliale cornifiée typique, présente lors de la phase de l'œstrus. (Barre d'échelle 20 μ m).

VI/ Etude de la perméabilité para-cellulaire de la barrière hémato-encéphalique : test du colorant bleu Evans (Evans blue dye Assay)

PRINCIPE

Plusieurs méthodes expérimentales sont utilisées pour évaluer le statut de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le modèle le plus largement utilisé dans les modèles expérimentaux est l'utilisation de colorants intra-vitaux (traceurs, marqueurs) appliqués par voie intraveineuse, qui peuvent traverser la BHE seulement quand celle-ci est rompue (del Valle et al. 2008). En effet, ayant un poids moléculaire supérieur à 180 Da, leur passage à

travers une barrière intacte est impossible. En termes de taille moléculaire, ces marqueurs représentent un large spectre de colorants dans lesquels la fluorescéine de sodium (NaFl, MW 376 Da) est l'une des plus petites, tandis que le bleu Evans (EB, MW 961 Da) est l'un des plus grands. Cependant, dans la circulation sanguine, ce dernier se lie fortement à la fraction albumine des protéines pour donner naissance à un complexe de haute masse moléculaire (EBA 68 500 Da). Le colorant bleu Evans est un traceur couramment utilisé pour l'estimation du volume plasmatique chez l'Homme et l'étude de la perméabilité vasculaire chez des modèles animaux, dont le principe est schématisé sur la figure 18A et B. Le bleu Evans est non toxique et non métaboliquement actif dans la circulation des mammifères. En raison de sa liaison rapide à l'albumine sérique et de l'absence d'absorption cellulaire, sa concentration plasmatique reste relativement constante dans les heures qui suivent l'injection intraveineuse. Par conséquent, son extravasation dans les organes centraux est corrélée à une fuite vasculaire de la sérum-albumine, et sa fuite dans le parenchyme cérébral indique une rupture de la BHE (figure 18B). Après injection en iv et un temps suffisant pour la circulation du traceur, l'encéphale est examiné par densité optique et/ou microscopie optique ou fluorescente. Nous avons choisi une évaluation par densitométrie qui ne permet pas de localiser ni les structures affectées ni les endroits où la BHE est potentiellement endommagée, mais permet une quantification globale de la perturbation de la perméabilité de la BHE (Wang and Lai 2014).

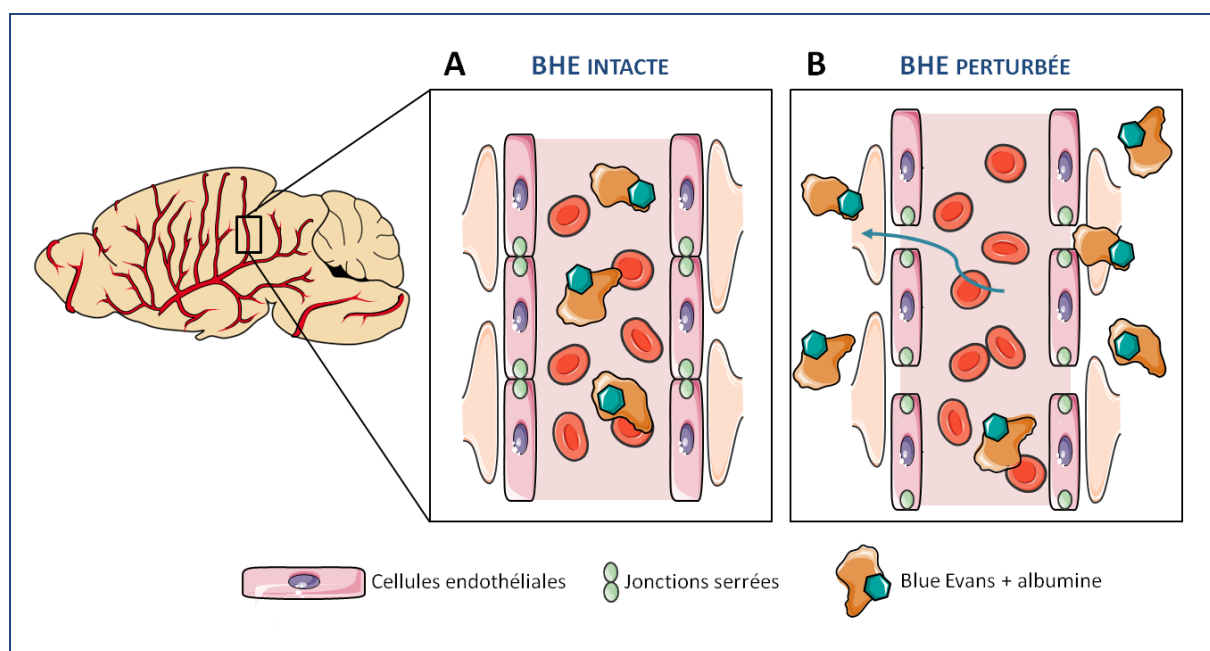


Figure 19 : Schéma du principe du test du colorant bleu Evans (Evans blue dye Assay)

Le bleu Evans, injecté dans la circulation sanguine, se complexe à l'albumine. Le principe de ce test repose sur l'incapacité du traceur à atteindre le compartiment cérébral lorsque la barrière hémato-encéphalique (BHE) est intacte, due à la présence de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales qui la constituent (A). Si cette barrière protectrice est perturbée et devient perméable (B), le complexe bleu Evans-albumine peut alors, par voie paracellulaire, atteindre le tissu cérébral. Sa présence peut ensuite être quantifiée par densitométrie optique.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Pour cette étude, nous avons constitué deux groupes d'animaux afin d'évaluer l'effet de la CNA sur la perméabilité paracellulaire de la BHE : le groupe CNA (n=5) chez lequel nous avons administré le traitement de chimiothérapie taxotère séquentiel, et le groupe vehcna (n=3) où seul le véhicule a été injecté aux animaux (figure 19). Nous avons anesthésié les animaux avec 1mL/Kg d'un mélange kétamine-xylazine (75mg/mL de Kétamine® 1000 virbac et 10mg/mL de Rompun 2% Bayer health care) par voie intra-péritonéale. La figure 20 représente le schéma des principales étapes du protocole expérimental : après la pose d'un cathéter au niveau de la veine jugulaire, de le bleu Evans (EB pour *evans blue*) (sigma) 4% dilué dans une solution saline (NaCl 0.9%), à 2 mL/kg (soit 80 mg EB/Kg) est injecté par voie

iv par un lent bolus (environ 1 minute). Deux heures après l'injection en iv du traceur pendant lesquelles l'EB circule, les rats sont perfusés en intracardiaque à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex®, Cole-Parmer® Instrument, Chicago, USA) avec une solution saline (NaCl 0.9%) héparinée pendant 15 minutes, à 2mL/min - jusqu'à ce que le liquide sortant de l'atrium droit devienne incolore (environ 250ml – 15min – 110mmHg). Ceci a pour but de nettoyer toutes traces d'EB dans la circulation sanguine, afin d'éviter toute contamination des tissus. L'encéphale ainsi que la ME sont ensuite prélevés puis, après avoir pesé chaque organe de chaque animal, on procède à l'extravasation de l'EB dans les tissus. Pour se faire, les tissus ont été immergés dans du formamide (sigma-aldrich), à 60°C pendant 48h, à raison de 10mL formamide/g de tissu.

Les lectures d'absorbance sont faites après 24 et 48h d'immersion. Pour mesurer la quantité d'EB dans le surnageant, nous avons réalisé une gamme standard avec des dilutions en série d'EB dans du NaCl 0,9%. La gamme était ainsi constituée des concentrations suivantes : 0 ; 1,56 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100µg/mL d'EB. La gamme, ainsi que les échantillons, ont été réalisés en triplicats, et 200µL par puit dans une plaque 96 puits ont été déposés. Le formamide pur a été utilisé comme vide (*blank*). La lecture de l'absorbance au spectrophotomètre (Multiskan™ GO, ThermoFisher Scientific, USA) à 620nm à ensuite était effectuée. Les résultats en µg d'EB/g de tissu seront exprimés en pourcentage par rapport au groupe contrôle.

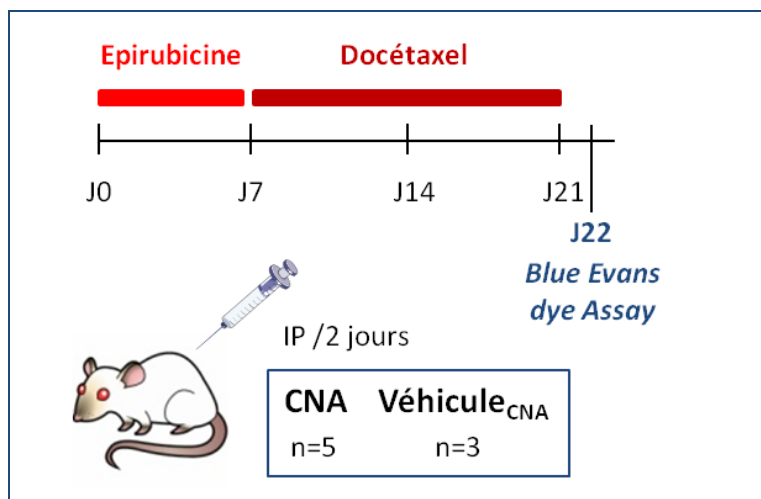


Figure 20 : Protocole expérimental pour l'étude de la perméabilité paracellulaire de la BHE

Pour cette étude 5 rates (Cohorte E) ont été traitées à la CNA (groupe CNA) et 3 ont reçu le véhicule (groupe contrôle). Le traitement CNA a été administré sur 3 semaines à partir de J0, avec l'administration de 4 injections d'épirubicine à 1mg/kg/injection suivies de 8 injections de docétaxel à 2mg/kg/injection les deux semaines suivantes (J7 à J21). Le lendemain de la dernière injection de docétaxel (J22), le test du colorant bleu Evans a été effectué.

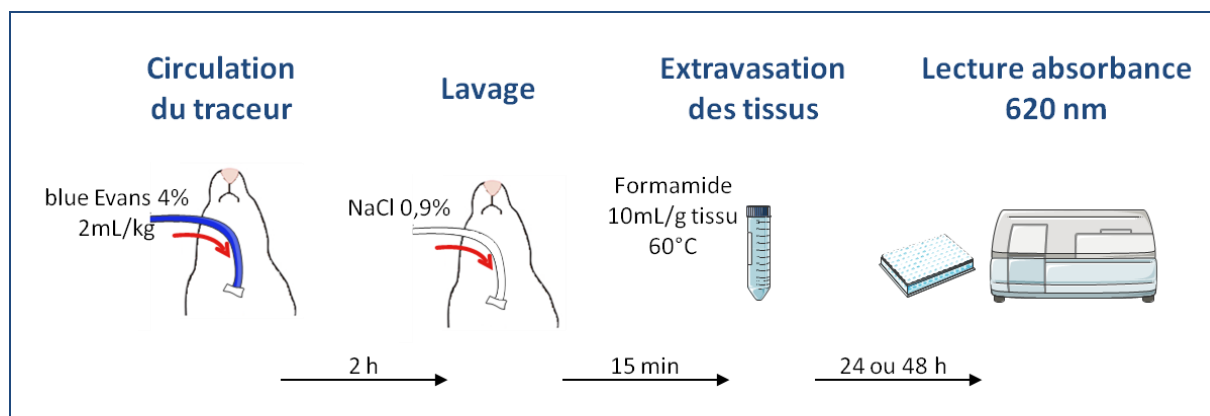


Figure 21 : Principales étapes pour l'étude de la perméabilité paracellulaire de la BHE par le test du colorant bleu Evans

Après anesthésie profonde des animaux, le colorant bleu Evans est administré par voie intra-veineuse. Après un délai de 2 heures pendant lequel le bleu Evans circule dans l'organisme, toute trace du colorant est éliminée de la circulation sanguine par lavage au NaCl 0,9% pendant 15 minutes. L'extravasation du bleu Evans de l'encéphale et de la moelle épinière se fait par immersion des tissus dans du formamide pendant 24 ou 48 heures à 60°C. Passé ce délai, le surnageant est prélevé afin d'effectuer des mesures de l'absorbance à 620nm. C'est à l'aide d'une gamme standard que la quantité de bleu Evans présent dans les tissus est calculée, et exprimée en μg de bleu Evans/g de tissu.

VII/ Analyse de la conduction nerveuse par enregistrements électrophysiologiques

Les mesures électrophysiologiques font parties des standards pour l'évaluation neurophysiologique objective des neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie en clinique humaine. Elles impliquent l'utilisation d'études de la conduction nerveuse qui mesure la vitesse de conduction (VC) ainsi que l'amplitude maximale du PAN. Ces mesures fournissent des informations précieuses sur l'étendue de la perte axonale chez les patients développant une NPCI. En effet, une diminution de l'amplitude maximale du PAN est une constatation commune chez les patients, confirmant le développement d'une axonopathie suite au traitement anti-tumoral (Chaudhry, Rowinsky et al. 1994, Park et al. 2013). Dans cette étude, nous avons enregistré et mesuré l'amplitude maximale de PAN ainsi que la VC du nerf sciatique des rats, en préparation *ex vivo*.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Après anesthésie profonde à l'uréthane (25%, 0,5 ml/100 g) des rats, les nerfs sciatiques ont été rapidement disséqués et immergés dans un milieu salin (NaCl 133, KCl 2, CaCl₂ 1, MgCl₂, HEPES 10 et glucose 10 pH 7,4) 5 minutes avant l'enregistrement. Le nerf sciatique a ensuite été placé sur des électrodes en argent chlorurées. Des impulsions électriques de forme rectangulaire de durée de 0,1 ms et d'amplitude variable sont générées par la routine Clampex du logiciel Pclamp (Axon Instruments, CA, USA) et appliquées à l'extrémité distale du nerf, à travers une interface Digidata 1322A (Axon Instruments, CA, USA). Les PAN ont été enregistrés à l'extrémité proximale du nerf (Δx = distance de 24 mm de l'électrode active) en utilisant un amplificateur différentiel ISO-DAM8A (World Precision Instruments, UK). Le signal a été filtré avec une bande passante de 10 à 10 000 Hz et numérisé à 500 kHz. L'artefact de stimulation a été obtenu de façon isolée en utilisant un

double protocole d'impulsion, puis soustrait des PAN enregistrés avant l'analyse avec le logiciel Pclamp. La VC du nerf a été calculée en utilisant la latence entre le début de l'artefact de stimulation et l'apparition de PAN (Δt) selon l'équation :

$$CV = \Delta x / \Delta t$$

VIII/ Détection de protéines au sein des tissus par immunohistochimie fluorescente

PRINCIPE

L'immunohistochimie fluorescente est une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu par la détection d'antigènes, au moyen d'**anticorps, révélé par fluorescence**. L'immunofluorescence indirecte, utilisée dans cette étude, est basée sur l'utilisation successive de deux anticorps : l'anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt contenant l'antigène recherché, et un second anticorps couplé à un fluorochrome qui possède une haute affinité pour l'anticorps primaire et dirigé contre son isotype.

PREPARATION DES TISSUS ET DES LAMES

Après anesthésie profonde des animaux à l'uréthane 25% (0,5 ml/100 g), les organes ont rapidement été disséqués. Les encéphales ont été congelés dans de la glace carbonique puis mis à -80°C , et les nerfs sciatiques ont été post-fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 48 h. Ces derniers ainsi post-fixés ont été ensuite immergés dans 15% de sucrose dans du tampon phosphate (PBS) pendant 24 h, suivie de 24 h dans 30% de sucrose-PBS. Ces échantillons ont ensuite été placés dans un milieu d'insertion (OCT, Tissue-Tek, Reichert-Jung, Nussloch, Allemagne) et mis à -80°C .

Les sections longitudinales de nerf (10 μm d'épaisseur) et les sections sagittales d'encéphale (15 μm) ont été réalisées à l'aide d'un cryostat CM 1950 (Leica biosystems, Nanterre, France)

et montées sur des lames en verre superfrost plus (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Ces lames sont ensuite stockées à -20°C.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les sections de tissus sur lame ont été pré-incubées pendant 2h avec du sérum normal de chèvre (NGS pour *normal goat serum*) 5% dans du PBS-tritonx100 (0.3%) utilisé comme solution de blocage des sites aspécifiques, avant incubation pendant une nuit à 4 ° C avec un anticorps primaire dilué dans cette même solution bloquante. La procédure continue par le rinçage de toutes les coupes trois fois par du PBS-tritonx100 (0.3%) (1x5 puis 2x10 minutes). Après 1 heure d'incubation à température ambiante dans l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage, les sections de tissus ont été rincées quatre fois dans du PBS (1x5 suivi de 3x10 minutes) et montées dans un milieu de montage glycérolé contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; contre-coloration des noyaux) et du 1, 4-Diazobicyclo-2,2,2-octane (DABCO™ ; agent protecteur de la fluorescence) (Abcam, Paris, France). Le montage lame-lamelle s'est effectué par l'utilisation d'eukitt (eukitt® quick-hardening mounting medium, Sigma-aldrich, St Louis, MO) puis les lames ont été stockées à 4°C, protégées de la lumière.

Tableau 14 : Liste des anticorps utilisés en immunomarquage fluorescent

Cible	Marqueur	Fournisseur - référence	Description	Dilution	Secondaire	Tissu
Neurofilament 200kDa	NF200	Sigma N0142	Mouse monoclonal	1:250	A488	Nerf sciatique
Macrophages	Cd11b/c	Abcam ab1211	Mouse monoclonal	1:300	A488 A555	Nerf sciatique
Cellules gliales (astrocytes, cellules Schwann)	GFAP	Abcam ab7260	Rabbit polyclonal	1:1000	A488	Nerf sciatique Encéphale
PO	NG2	Abcam ab50009	Mouse monoclonal	1:300	A488	Encéphale
Cellules prolifératives	Ki67	Abcam ab15580	Rabbit polyclonal	1:500	A555	Encéphale
Cellules leucocytaires	CD45	Abcam ab10558	Rabbit polyclonal	1:200	A488	Encéphale

PO : cellules progénitrices d'oligodendrocytes

VISUALISATION/OBSERVATION

Les préparations ont été examinées sous un microscope à épifluorescence laser multicanaux (Olympus DP73, Hambourg, Allemagne), avec filtre GFP, TRITC ou DAPI.

La quantification (comptage et/ou mesure de la valeur moyenne de gris de l'immunoréactivité) a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ, en moyennant 3 coupes de tissus par animal.

IX/ Détection de la protéine NF200 dans le nerf sciatique par western blot

En complément de l'immunomarquage par fluorescence de la protéine NF200, nous avons utilisé la technique du western blot.

PRINCIPE

Le western blot est une technique analytique de transfert sur membrane permettant la détection, à l'aide d'anticorps, de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Cette technique permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe contenant plusieurs protéines. Pour ce faire, les protéines d'un échantillon sont séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. Après transfert sur une membrane, un anticorps spécifique est ensuite utilisé pour détecter la protéine d'intérêt. Le résultat permet donc de déterminer le poids moléculaire, mais surtout la quantité relative de la protéine étudiée.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Les nerfs sciatiques ont été prélevés et immédiatement congelés à -80 °C sur de la glace carbonique. Pour l'extraction des protéines, nous avons utilisé un tampon de lyse EDTA

/ HEPES complété par des inhibiteurs de protéase (comprimés ULTRA complets sans EDTA, Roche, Bâle, Suisse) puis les lysats de protéines ont été centrifugés 10 minutes à 4°C à 10000 × g. L'extrait de protéine (20 µg par puit) a été séparé par électrophorèse sur un gel 4-20% de polyacrylamide préfabriqué (gels mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™, Bio-Rad) et transféré sur une membrane en PolyVinylidene Fluoride (PVDF), préalablement traitée à l'éthanol absolu, dans une cellule de transfert électrophorétique Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Les membranes ont été saturées avec une solution bloquante, puis incubées pendant une nuit à 4 ° C avec des anticorps primaires contre le neurofilament NF200, et l' α -tubuline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) utilisé comme contrôle de chargement. La détection par chimiluminescence a été réalisée en utilisant des anticorps secondaires IgG-H.R.P de souris (Abliance, Compiègne, France) et un substrat ECL occidental Clarity™ (Bio-Rad) dans un système d'imagerie Bio-Rad ChemiDoc MP. Le signal NF200 normalisé à la protéine α -tubuline a été analysé à l'aide du logiciel Image Lab™. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (+ SEM).

X/ Dosage de la concentration sérique de cytokines par cytométrie en flux

Il est connu que la chimiothérapie exerce des effets immuno-modulateurs systémiques et stimulent également la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules gliales du système nerveux (Lees, Makker et al. 2017). Des études dans différents modèles animaux, mais également chez des patients, montrent que les médiateurs pro-inflammatoires (en particulier le TNF- α) sont associés au développement des douleurs neuropathiques, ainsi qu'aux changements cérébraux structurels et fonctionnels associés aux troubles cognitifs suite

au traitement anticancéreux (Leung and Cahill 2010, Ganz et al. 2013, Kesler, Janelins et al. 2013, Lacourt and Heijnen 2017). Pour réaliser le dosage de cytokines pro-inflammatoires circulantes, nous avons utilisé le test BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA-BioScience, Montana, USA). Ce kit a permis de mesurer la concentration sérique de deux cytokines pro-inflammatoire, à savoir le TNF- α ainsi que l'interféron (IFN), et de l'interleukine-4 et 10 (IL-4 et IL-10), deux cytokines anti-inflammatoires.

PRINCIPE

Les tests BD™ CBA fournissent une méthode de capture d'un ensemble de protéines solubles grâce à des billes de taille et de fluorescence connues, permettant de détecter les analytes en utilisant la cytométrie de flux. Ces billes de capture sont conjuguées à un anticorps spécifique dirigé contre les protéines d'intérêts que l'on cherche à détecter et à doser (figure 22). Le réactif de détection est un mélange d'anticorps conjugués à la phycoérythrine (PE), qui fournit un signal fluorescent proportionnel à la quantité de protéine liée (figure 22B). Lorsque les billes de capture et le réactif détecteur sont incubés avec un échantillon inconnu contenant des protéines solubles reconnus, des complexes dits en « sandwich » (billes de capture - analyte - réactif de détection) sont formés (figure 22A). Ces complexes peuvent être mesurés en utilisant un cytomètre en flux pour identifier les particules ayant des caractéristiques spécifiques de la bille de capture, et fluorescentes du détecteur.

AVANTAGES

L'utilisation du test BD™ CBA s'apparente à réaliser plusieurs tests ELISA (pour *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) en concomitants, en utilisant la cytométrie de flux. Les tests BD™ CBA de protéines solubles étant plus sensibles que les tests ELISA, ils nécessitent donc un volume d'échantillon réduit. Un autre avantage réside également dans le fait que les tests BD™ CBA de protéines solubles permettent de réaliser une analyse

simultanée multiplexée de plusieurs protéines à partir d'un seul échantillon, et présente une haute pertinence statistique via le nombre important de particules de capture de protéines en suspension.

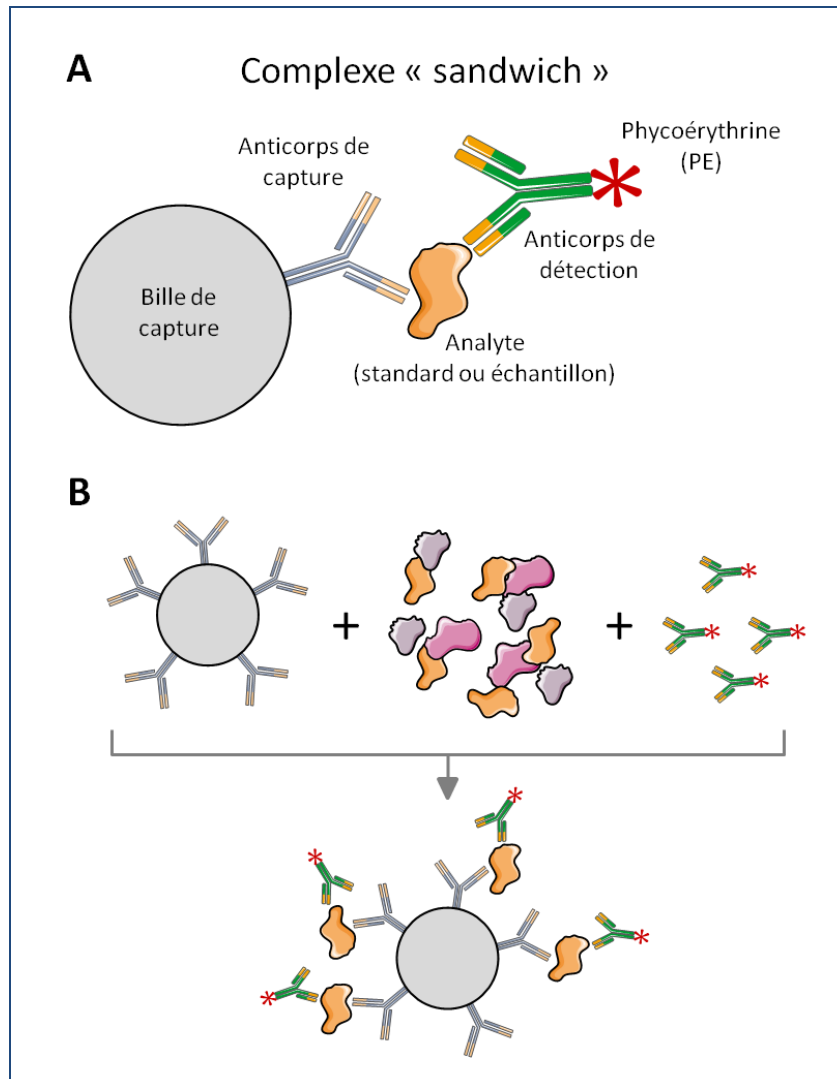


Figure 22 : Principe du dosage d'analytes par cytométrie en flux

Des billes de capture aux propriétés de taille et de fluorescence distinctes, et respectivement couplées à des anticorps de détection spécifique des cytokines d'intérêts, sont mises en présence des échantillons. Les anticorps de détection conjugués à la phycoérythrine (PE) se lient également aux échantillons, formant ainsi un complexe « sandwich » constitué de la bille de capture, de l'analyte et de l'anticorps de détection (A). De cette façon, après lavage et analyse par le logiciel FCAP Array™, ce mélange donnera un signal fluorescent proportionnel à la quantité de cytokines liées (B) dont la concentration de cytokines pourra être calculée grâce à une courbe standard.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Après anesthésie profonde des animaux par un mélange kétamine/xylazine, nous avons réalisé une ponction intracardiaque. Le sang ainsi prélevé a été centrifugé à 1730 x g pendant 30 minutes à 4°C, afin d'en extraire le sérum qui a ensuite été conservé à -80°C. Pour doser la concentration sérique en cytokines à l'aide du kit BDTM CBA (BioScience, Montana, USA), nous avons suivi le protocole indiqué par le fabricant. Les standards BDTM CBA *rat soluble protein flex set* permettant d'obtenir les concentrations absolues (exprimées en pg/mL) des cytokines d'intérêts ont été reconstitués avec 4mL de tampon de dilution. Après 15 minutes à température ambiante, une dilution en cascade a été réalisée afin d'obtenir les concentrations finales au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 et au 1/256 (soit des concentrations de 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156, 80 et 40 pg/mL). Le contrôle négatif correspond à la solution de tampon de dilution uniquement. Pour l'analyse en cytométrie de flux, 50 µL de sérum et/ou de standard ont été ajoutés à 50 µL de la suspension de billes de capture, puis laissé incuber 1h à température ambiante, avant d'ajouter 50 µL du réactif de détection. Après 2h d'incubation à température ambiante et surtout à l'abri de la lumière, les mélanges ont été lavés avec 1mL de tampon puis centrifugé à 200 x g pendant 5 minutes. Le culot obtenu a ensuite été suspendu dans 300 µL de tampon de lavage. L'acquisition a été faite par un cytomètre de flux BD Accuri C6 plus (BioScience, Montana, USA) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel FCAP ArrayTM. Le seuil de détection est de 27,7 et 6,8 pg/mL pour le TNF- α et l'IFN respectivement, et de 3 et 10 pg/mL pour l'IL-4 et l-IL10.

XI/ Analyses statistiques

Toutes les données sur les graphiques représentent la moyenne $\pm$ SEM. Les différences statistiques ont été évaluées par le test d'analyse de la variance ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey ou de Dunnett, ou par des tests t de Student. Les données qui ne présentent pas de distribution gaussienne suivant la loi Normale (test de Shapiro-Wilk) ont été analysées par des tests non-paramétriques (test de Mann-Whitney, de Wilcoxon, de Kruskal-Wallis ou de Friedman). L'analyse a été effectuée avec le logiciel GraphPad-Prism 6 (GraphPad-Prism, San Diego, CA, USA). Comme habituellement, une valeur p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

RESULTS



I/ Caractérisation du modèle

A ce jour, aucune étude chez l'animal n'a reproduit les troubles du système nerveux causés par la CNA combinant de manière séquentielle l'EPI et le DO, qui est actuellement le standard dans le traitement des cancers du sein (Kaufmann, von Minckwitz et al. 2003, Smith, Pang et al. 2013). Dans l'optique d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les dommages CNA-induits, le premier objectif a été de modéliser et de caractériser les altérations périphériques et centrales induites par la CNA dans un modèle animal (rats femelles) grâce à une approche multidisciplinaire (comportemental, électrophysiologique, biochimique et histopathologique).

I.1. Effet de la CNA sur le poids des animaux

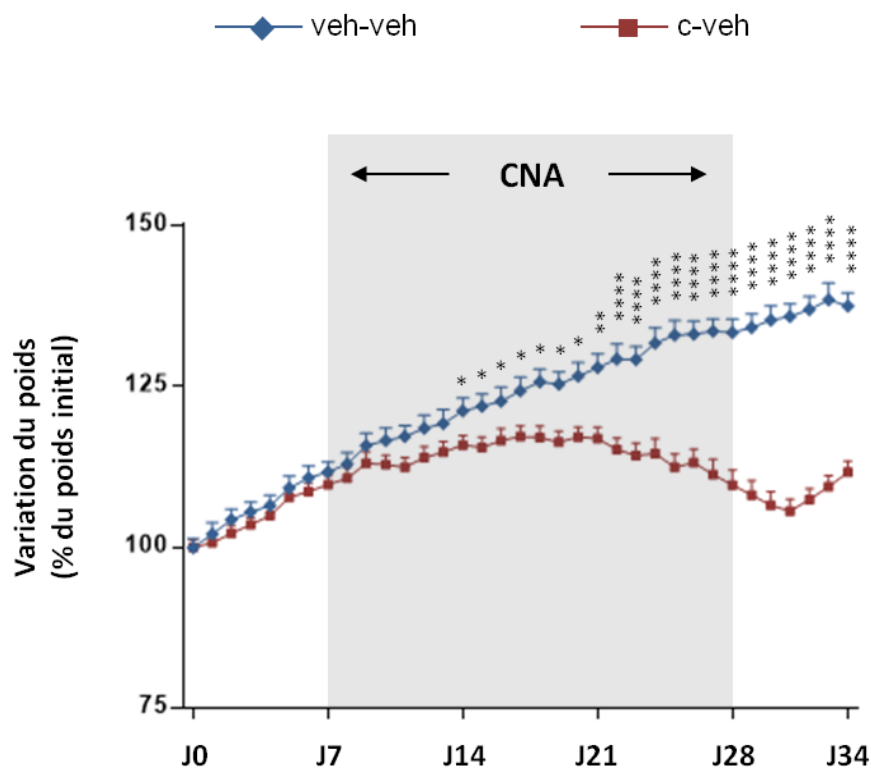


Figure 23 : Cinétique de la variation du poids des rats

Le poids a été mesuré quotidiennement chez les rats recevant le véhicule (groupe veh-veh ; n=12) ou la CNA (groupe c-veh ; n=12) (données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Les traitements ont été administrés tous les deux jours à partir de J7 jusqu'à J28. Chaque valeur représente la moyenne (+ SEM). Les différences statistiques, utilisant un test Mann-whitney, entre le groupe contrôle et le groupe c-veh pour chaque jour sont indiquées * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Le poids des animaux a été mesuré quotidiennement chez les rats recevant la CNA ou le véhicule. La cinétique de la prise de poids des animaux durant l'expérimentation est représentée sur la figure 23. Au cours de la première semaine (de J0 à J7), c'est-à-dire avant de démarrer l'administration de la CNA à J7, la prise de poids est progressive pour tous les animaux, sans présenter de différence entre les groupes. A partir de J11, soit 5 jours après le début de la CNA (administration d'EPI), la prise de poids des animaux CNA ralentit et devient, à J14, significativement moins importante que celle des contrôles, où les animaux CNA sont à 115 % de leur poids initial alors que le groupe contrôle est à 120 % ($p < 0,05$). Contrairement aux animaux contrôles qui ont une croissance linéaire de leur poids, les animaux CNA stagnent à 115 % de leur poids initial, ceci pendant une semaine jusqu'à J21 (soit deux semaines après le début du traitement CNA). A J21 la perte de poids des animaux recevant la CNA s'aggrave, jusqu'à atteindre à J32 (soit 4 jours après la dernière administration de CNA), une valeur minimale de 105 % de leur poids initial, alors que les animaux contrôles sont en moyenne à 135 % de leur poids initial ($p < 0,0001$). Après J32 on observe une réversion significative ($p < 0,01$, comparaison des poids entre J32 et J34) de la perte de poids chez les animaux traités à la CNA pour atteindre à J34 (correspondant à la fin de l'expérimentation) 112 % de leur poids initial.

I.2 Effet de la CNA sur les capacités locomotrices

L'étude de la locomotion des animaux a été réalisée à J34, correspondant au dernier jour d'expérimentation, à l'aide d'un système d'analyse de la marche (Catwalk). Cette analyse permet d'évaluer les effets de la CNA sur les paramètres locomoteurs, mais aussi de vérifier l'existence ou non de biais moteurs pouvant affecter les résultats obtenus dans les autres tests comportementaux. Les paramètres mesurés, dont les résultats sont représentés sur la figure 24, sont la séquence de la marche (encore appelé indice de régularité) exprimé en pourcentage

(figure 24A), le support de la marche (ou base de soutien) exprimé en cm (figure 24B), et l'intensité de l'empreinte des pas exprimée en unité arbitraire (figure 24C). Les animaux ayant suivi le traitement CNA présentent une séquence de la marche identique à celle observée chez les animaux contrôles ($95,7 \pm 2,31$ % et $96,8 \pm 2,35$ % respectivement) (figure 24A), suggérant que la CNA n'affecte pas la coordination motrice. Concernant l'équilibre, on n'observe également aucune différence entre les deux groupes, aussi bien au niveau des membres antérieurs où les animaux CNA présentent un support de la marche de $3,45 \pm 0,33$ cm et $3,54 \pm 0,17$ cm pour les animaux contrôles, qu'au niveau des membres postérieurs ($4,09 \pm 0,44$ cm et $3,94 \pm 0,27$ cm pour les animaux CNA et contrôles respectivement) (figure 24B). Enfin, les résultats montrent que la CNA ne modifie pas non plus l'intensité de la pression des pas, ni au niveau des membres antérieurs ($87,15 \pm 9,37$ comparer à $86 \pm 12,01$ chez les contrôles), ni au niveau des membres postérieurs ($80,5 \pm 8,27$ et $79,43 \pm 9,73$ pour les animaux CNA et contrôles respectivement) (figure 24C).

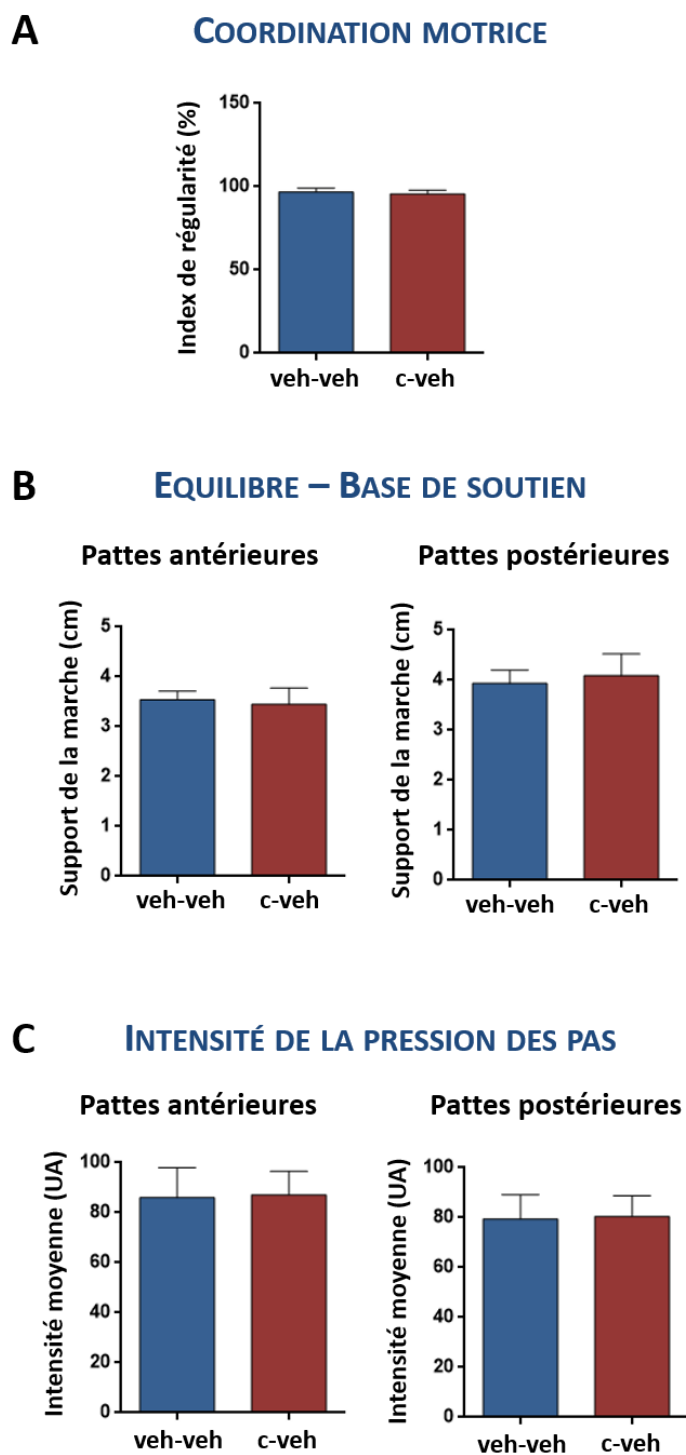


Figure 24 : Effet de la CNA sur les paramètres de la locomotion des rats

L'index de régularité (A), le support de la marche (B) et l'intensité de la pression des pas (C) ont été mesurés par un système d'analyse de la marche (Catwalk) à J34 chez les rats contrôles (veh-veh ; n=12) et traités à la CNA (groupe c-veh ; n=12) (données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Chaque valeur représente la moyenne (+ SEM). Un test Mann-Whitney a été effectué pour réaliser les analyses statistiques.

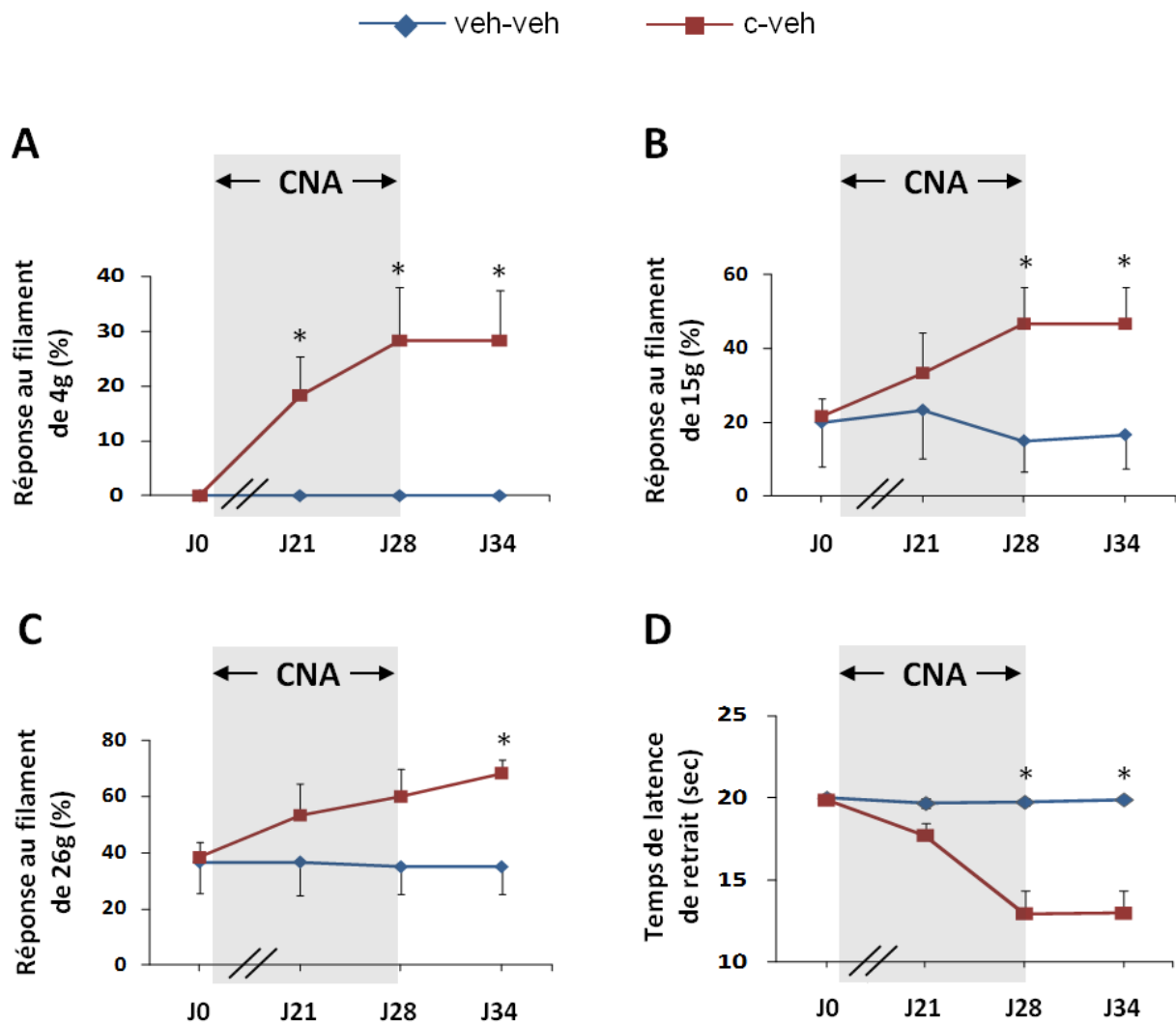


Figure 25 : Effet de la CNA sur la sensibilité nociceptive

Cinétique d'installation de l'allodynie (A) et de l'hyperalgie (B, C) mécanique induite par le traitement CNA. Les graphiques montrent la moyenne (+ SEM) du pourcentage de réponses de retrait de la patte suite à la stimulation mécanique par le filament de von Frey de 4 (A), 15 (B) ou 26 g (C) ($n=6$ animaux par groupe) (données issues de la cohorte A – Tableau 13). L'histogramme (D) montre les effets du traitement CNA sur la sensibilité thermique au froid chez les rats, évaluée par le test à l'acétone. Chaque point représente la moyenne (+ SEM) des 6 observations faites chez les 6 rats. Les différences statistiques, utilisant un test Mann-Whitney, entre le groupe contrôle et le groupe c-veh pour chaque jour de test sont indiquées. * $p<0,05$.

I.3. Effet de la CNA sur le système nerveux périphérique

I.3.1. Effet de la CNA sur la sensibilité nociceptive

I.3.1.1. Evaluation de l'allodynie et de l'hyperalgie mécanique

La sensibilité nociceptive mécanique a été évaluée en utilisant le test des filaments de von Frey. Le niveau de sensibilité des animaux a été quantifié en calculant le pourcentage de retrait de la patte en réponse à des stimulations répétées par ces filaments.

Avant le début du traitement, les animaux ne présentent pas de réponse suite à une stimulation de 4 g. Pour des stimulations par les filaments de 15 et 26 g, les réponses observées sont respectivement de 20 ± 12 et de 37 ± 11 %. Pour les animaux recevant le véhicule (groupe veh-veh), ce taux de réponse reste inchangé tout au long de l'expérimentation (figure 25A-C). En revanche, à partir de J21, soit deux semaines après le début du traitement CNA, les rats traités à la chimiothérapie (groupe c-veh) répondent au filament de von Frey de 4 g avec une fréquence significativement plus élevée (de 0 % avant le traitement CNA à 18 ± 7 % ; $p < 0,05$), qui atteint un plateau maximal de 28 ± 10 % ($p < 0,05$) en moyenne à partir de J28 jusqu'à la fin de l'expérience (figure 25A). Cette augmentation de la fréquence de retrait de la patte reflète l'installation d'une allodynie mécanique chez les animaux c-veh. On observe également une hyperalgie mécanique visualisée par l'utilisation des filaments de von Frey de plus gros calibres. En effet, les animaux c-veh répondent de manière plus fréquente aux filaments de 15 et de 26 g, passant de 21,6 et 38,3 à J0 à 47 ± 10 et 68 ± 5 % à J34 ($p < 0,05$ comparé au groupe veh-veh (Figure 25B et 25C).

Tous ces résultats montrent que le traitement par la CNA induit une allodynie et une hyperalgie mécanique, qui débutent deux semaines après le début de la chimiothérapie et qui persistent au moins une semaine après la fin du traitement.

I.3.1.2. Evaluation de l'allodynie thermique au froid

L'allodynie thermique au froid a été évaluée par le test de la goutte à l'acétone, dont les résultats sont représentés sur la figure 25D. Avant le début de la CNA, aucune réaction de retrait de la patte suite au dépôt de la goutte d'acétone n'a été observée pendant la période des 20 secondes d'observation. Alors que ceci reste inchangé tout au long de l'expérience chez les animaux témoins, à partir de J21 et jusqu'à la fin de l'expérience les animaux c-veh répondent en revanche à l'acétone avec une latence moyenne décroissante de $17,7 \pm 0,8$ s à J21 à $12,9 \pm 1,4$ s à J28. Cette dernière valeur est significativement différente par rapport à celle observée avec le groupe veh-veh ($19,9 \pm 0,1$ s ; $p < 0,05$) (figure 25D). Ces résultats montrent que le traitement CNA induit une allodynie thermique au froid.

I.3.2. Altérations morpho-fonctionnelles du nerf sciatique induites par la CNA

I.3.2.1. Evaluation des paramètres neurophysiologiques

Les altérations des paramètres du PAN ainsi que de la conduction nerveuse sont généralement associées à la NPCI, aussi bien chez les patients que dans les modèles animaux. De ce fait, les paramètres amplitude maximale et VC du PAN ont été analysés dans cette étude par des enregistrements électrophysiologiques du PAN du nerf sciatique sur une préparation *ex vivo*. Les résultats montrent que ces deux paramètres sont affectés par le traitement CNA, qui conduit à une forte diminution de l'amplitude maximale du PAN (figure 26A) et à une réduction relativement plus modeste de la VC (figure 26B). Des valeurs moyennes globales de $4,0 \pm 0,6$ et $2,1 \pm 0,3$ mV et de $45,6 \pm 0,6$ et $37,6 \pm 0,9$ m/s ont été obtenues pour les rats veh-veh et c-veh ($p < 0,01$ et $p < 0,0001$) correspondant à une réduction de 47,5 et 17,5 % respectivement.

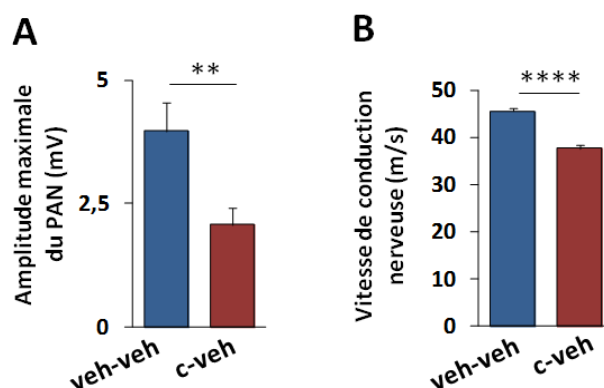


Figure 26 : Effet de la CNA sur les propriétés électrophysiologiques de la conduction du potentiel d'action du nerf sciatique

Les histogrammes montrent l'amplitude maximale du PAN (A) et la vitesse de conduction (B) moyennes obtenues pour les rats traités avec le véhicule (n=4) ou la chimiothérapie (n=6) (données issues de la cohorte A – Tableau 13). Un test Mann-Whitney a été effectué pour les analyses statistiques. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

I.3.2.2. Evaluation de l'intégrité axonale

Etant donné que l'amplitude maximale du PAN est directement liée au nombre de fibres fonctionnelles recrutées, sa réduction suggère une diminution du nombre de fibres nerveuses fonctionnelles, provoquée par une possible axonopathie. Pour évaluer la souffrance axonale et déterminer si le traitement CNA modifie l'organisation structurelle des axones périphériques, nous avons utilisé un marquage immuno-histochimique pour évaluer le niveau d'expression d'une des protéines du cytosquelette neuronal NF200, marqueur neuronal, dans les nerfs sciatiques. Les résultats montrent que la CNA diminue fortement l'immuno-marquage de la protéine NF200 dans les axones du nerf sciatique (figure 27A et 27B) par rapport au contrôle. L'analyse quantitative, utilisant le logiciel Image-J, de l'intensité de fluorescence moyenne révèle une diminution de 60 % de l'immuno-marquage de la protéine NF200 dans le nerf sciatique des animaux c-veh par rapport aux témoins ($p < 0,01$) (Figure 27B). Ce résultat est confirmé par une analyse Western blot qui révèle une diminution d'environ 55 % de l'expression de la protéine NF200 dans l'extrait protéique des nerfs sciatiques des rats traités par la CNA par rapport au groupe véhicule ($p < 0,01$) (Figure 27C et 27D).

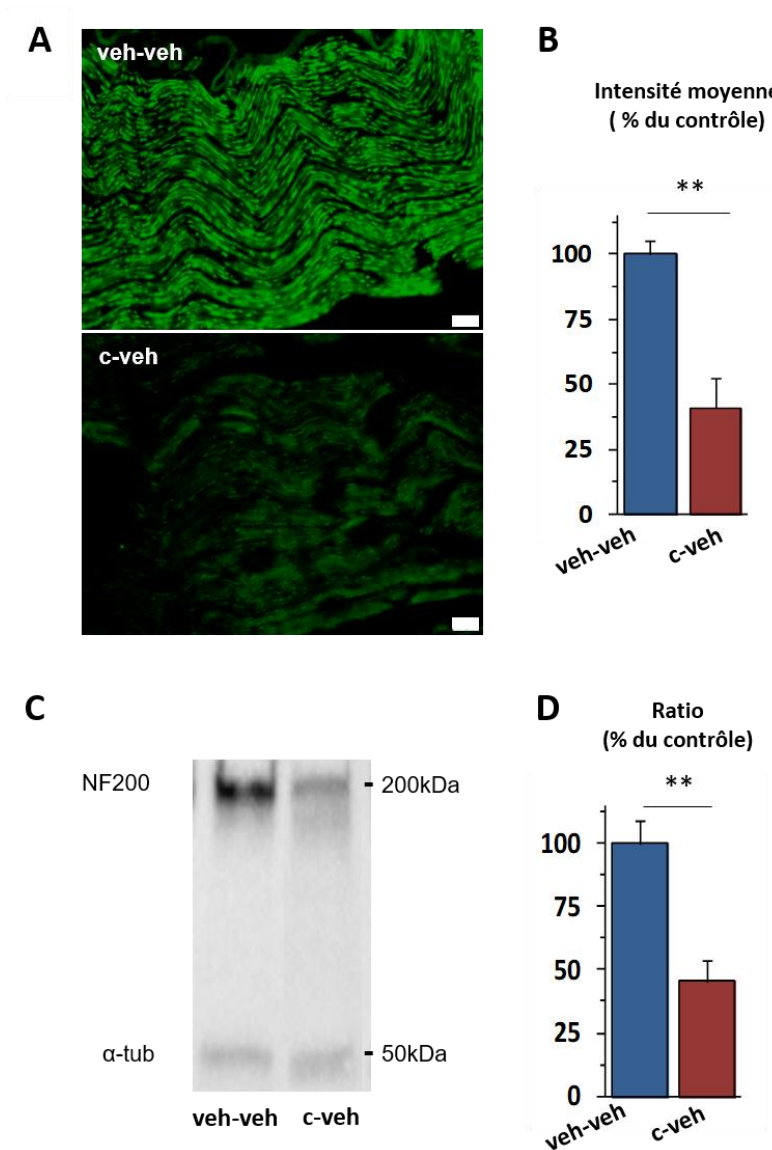


Figure 27 : Effet de la CNA sur le niveau d'expression de la protéine NF200

Les histogrammes représentent une quantification de l'expression de la protéine NF200 visualisée par immunofluorescence (A, B) et western blot (C, D) au niveau du nerf sciatique des rats. (A) Photomicrographies de l'immunoréactivité de la protéine NF200 au niveau de coupes sagittales de nerf sciatique des rats traités avec le véhicule (veh-veh ; n=6) ou avec la CNA (c-veh ; n=6) (données issues de la cohorte A – Tableau 13) (barre d'échelle 20 µm). Les tranches des nerfs sciatiques ont été marquées avec l'anticorps monoclonal NF200 révélé avec un anticorps secondaire conjugué à Alexa-488. L'analyse comparative de l'intensité moyenne de NF200 détecté dans les sections du nerf sciatique est montrée en (B). Chaque valeur est exprimée en pourcentage (+ SEM) de l'intensité de fluorescence moyenne détectée chez les rats veh-veh. Le niveau d'expression de la protéine NF200 est représenté par le Western blot typique de l'extrait de la protéine NF200 du nerf sciatique obtenu à partir des deux groupes d'animaux (C). L'histogramme (D) montre les valeurs moyennes normalisées (+ SEM) quantifiées pour chacun des deux groupes. L'α-tubuline (α-tub) a été utilisée comme contrôle de chargement lors du Western blot. Un test Mann-Whitney a été effectué. ** p < 0,01.

I.4. Effet de la CNA sur le système nerveux central

I.4.1. Evaluation des capacités mnésiques par un test de mémoire spatiale

Chez les patientes, en plus de toucher les fonctions exécutives et les processus attentionnels, les déficits chimio-induits concernent en particulier des dysfonctionnements de la mémoire épisodique et de la mémoire de travail. Pour évaluer les capacités mnésiques dans notre modèle d'étude, nous avons choisi d'utiliser le test du *Spatial object recognition*. Ce test cognitif permet l'étude de la mémoire spatiale chez le rongeur, considérée comme une mémoire de type *episodic-like*, et connue comme directement liée à l'intégrité de l'hippocampe (Tuscher, Szinte et al. 2016).

I.4.1.1. Choix des distances et optimisation du test

- **Choix des distances**

Pour déterminer le déplacement seuil au delà duquel les animaux naïfs détectent un changement dans l'environnement spatial, nous nous sommes basés sur les travaux de Cès (Cès, Burg et al. 2018). Utilisant des rats naïfs, nous avons testé différentes distances de déplacement (5, 10, 15, 20, 25 et 30 cm) (figure 28A et B). Après une semaine d'acclimatation et d'habituation à l'expérimentateur, et après une phase de familiarisation à l'enceinte sans puis avec objets, globalement on voit qu'en moyenne les animaux ne détectent pas le changement lorsque l'objet est déplacé de 5, 10 ou 15 cm, puisque nous obtenons des index de valeur moyenne respective de $-0,009 \pm 0,08$, $0,005 \pm 0,15$ et $-0,035 \pm 0,05$ (Figure 28B). A partir d'un déplacement de 20 cm, bien qu'il n'y ait pas de différence significative par rapport aux distances de 5, 10 et 15 cm, on observe en moyenne un index de $0,24 \pm 0,07$, indiquant une détection du changement par les rates. Un déplacement de 25 et 30 cm de l'objet donne des index de $0,39 \pm 0,06$ et $0,45 \pm 0,08$, statistiquement différents des index nuls obtenus pour les distances de 5, 10 et 15 cm ($p < 0,05$).

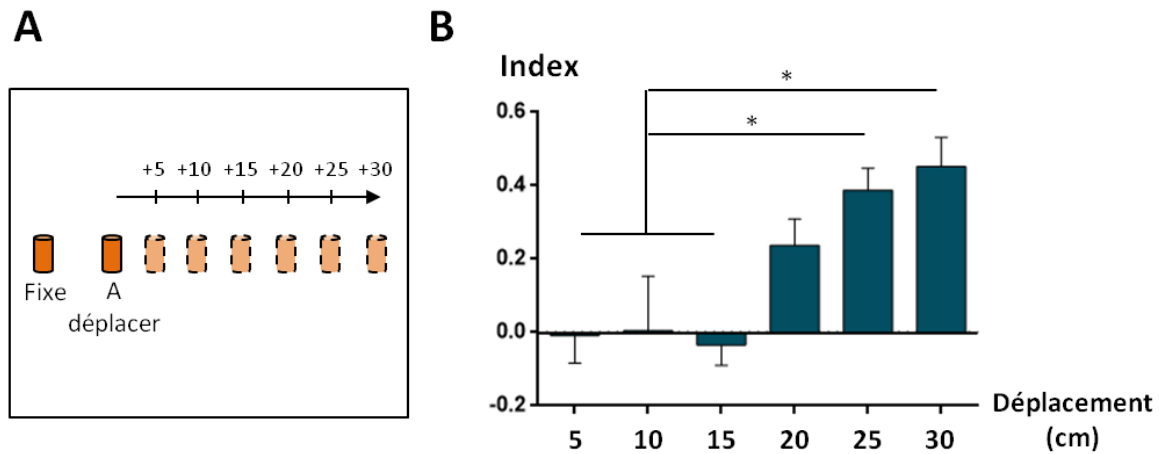


Figure 28 : Performance de la mémoire spatiale des rats naïfs selon une gamme de déplacement de l'objet

L'évaluation de la plus petite distance de détection lors du test du « Spatial object recognition » pour des rats naïfs ($n=5$) a été réalisée (données issues de la cohorte D – Tableau 13). En (A) est représenté le schéma du dispositif de test comprenant l'éventail de distances testées. Les histogrammes (B) montrent les index de discrimination moyen (+ SEM) obtenus pour un déplacement de l'objet de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 cm. Les différences statistiques obtenues par un test de Friedman sont représentées. * $p<0,05$.

• Optimisation du temps d'exploration

En se basant sur les travaux de van Hagen et ses collègues (van Hagen, van Goethem et al. 2015) qui excluent les animaux de l'étude si le temps d'exploration des objets est <10 s lors de la phase d'apprentissage et/ou de test, nous avons été contraints d'exclure la plupart des animaux lors de notre première étude où les objets étaient positionnés de manière centrale au dispositif. En effet, lors de la phase d'apprentissage, 7 animaux sur 30 présentent un temps d'exploration total des deux objets inférieur à 10 secondes, et 20 sur 30 lors de la phase de test. Alors même que certains animaux n'explorent pas du tout les objets (temps d'exploration de 0 seconde), ceci nous a conduit à exclure les données de près de 80 % des animaux (25 sur 30 en considérant la phase d'apprentissage et de test réunies) (Figure 29).

Afin d'augmenter le temps d'exploration dans le but d'optimiser le test, et d'éviter l'exclusion des animaux considérés comme non explorant, nous avons évalué les effets de l'emplacement des objets sur le temps d'exploration. Nous avons ainsi comparé les temps

d'exploration obtenus lorsque les objets sont placés au centre de l'enceinte et en périphérie qui est une situation moins anxiogène pour les rongeurs (figure 29). On remarque que la disposition des objets en périphérie permet au moins de doubler le temps d'exploration des rats ($p < 0,01$). En effet, les valeurs obtenues sont de $18,9 \pm 2,5$ s et $8,2 \pm 1,4$ s pour la phase d'apprentissage et la phase de test respectivement pour la disposition « centrale », alors qu'elles sont de $41,4 \pm 2,1$ s et $24,1 \pm 1,1$ s en condition « périphérie ». Cette augmentation du temps d'exploration permet de minimiser, voire même d'empêcher l'exclusion de rats, puisque aucuns rats en condition « périphérie » ne présentent un temps d'exploration inférieur à 10 secondes.

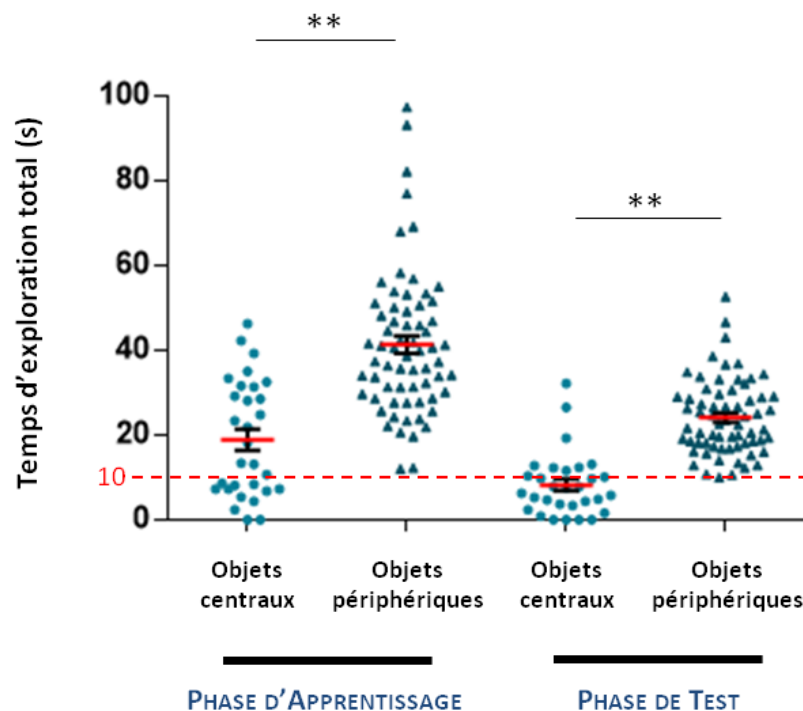


Figure 29 : Effet de la disposition centrale ou périphérique des objets sur le temps d'exploration des rats lors du test du « spatial object recognition»

Pour chaque animal le temps d'exploration total des deux objets a été mesuré lors des 5 minutes de la phase d'apprentissage et de la phase de test, et sont reportés ici en fonction de la disposition périphérique (triangles, $n=66$) ou centrale (cercles, $n=30$) des objets dans le dispositif du test (données issues des cohortes 1, 2 et 3 – Tableau 13). Les barres rouges représentent le temps d'exploration moyen ($\pm$ SEM) obtenu dans chacune des deux dispositions des objets. Les différences statistiques obtenues par des tests Wilcoxon entre les deux dispositions lors d'une même phase (apprentissage ou test) sont représentées. ** $p < 0,01$.

I.4.1.2. La CNA affecte la mémoire spatiale

Pour évaluer la mémoire spatiale de détail et mettre en avant les premiers signes de déficits cognitifs potentiels, on évalue en principe un déplacement d'objet proche des limites de détection, qui correspond dans cette étude à 20 cm de déplacement. De plus, en modulant les distances, on peut jouer sur la difficulté de la tâche rencontrée par les rats. Ainsi, un déplacement proche des limites de détection (déplacement de 20 cm) sera considéré comme difficile, et un déplacement plus grand (déplacement de 30 cm) sera jugé facile.

Une semaine après l'arrêt du traitement chimiothérapique (J34), pour une tâche jugée difficile c'est-à-dire au seuil de détection du changement pour des animaux sains, les rats contrôles présentent un index de discrimination de $0,51 \pm 0,06$, alors qu'il est seulement de $0,07 \pm 0,07$ en moyenne chez les rats ayant suivi le traitement CNA ($p < 0,0001$) (figure 30A). Un index de discrimination proche de la valeur zéro signifie qu'il n'y a aucune préférence d'exploration entre l'objet fixe et l'objet déplacé. Classiquement un rat passe plus de temps à explorer l'objet déplacé s'il se souvient de la place familière, ce qui reflète l'utilisation de processus d'encodage et de mémorisation. On considère que la mémoire spatiale est intacte quand l'animal passe significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé durant la phase de test, qui donne alors un index supérieur à la valeur 0. L'index faible présenté par les animaux ayant suivi le traitement CNA évoque donc un déficit mnésique induit par la chimiothérapie. Il en est de même lorsque la tâche est jugée facile (déplacement de l'objet de 30 cm), où les performances mnésiques sont également diminuées suite à la CNA comparé aux animaux contrôles (index de $0,10 \pm 0,08$ et de $0,50 \pm 0,06$ respectivement ; $p < 0,001$) (figure 30B).

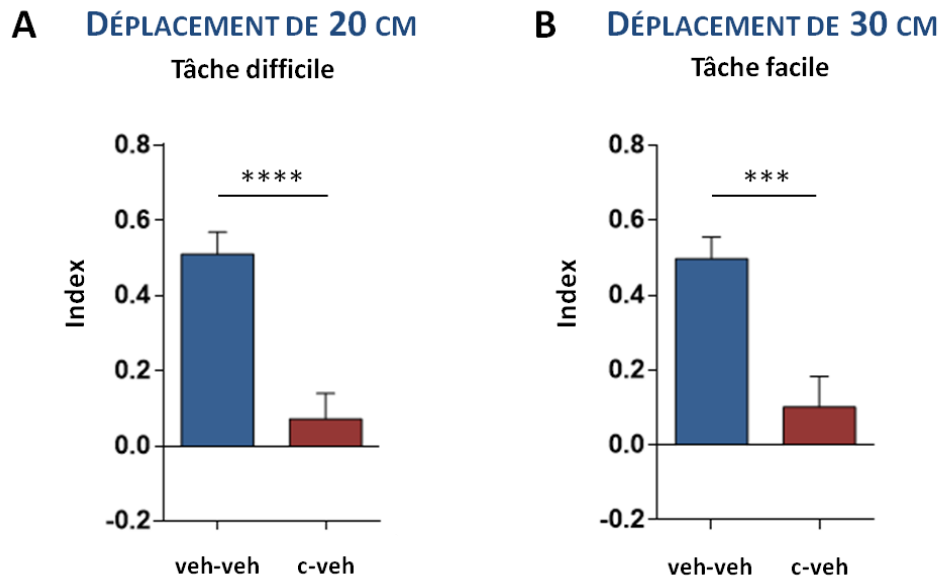


Figure 30 : Effet de la CNA sur les performances mnésiques des rats

Les performances de la mémoire spatiale ont été évaluées par le test du « Spatial object recognition ». Les données correspondent aux performances cognitives obtenues en fin d'expérimentation (J34). Les histogrammes montrent les index de discrimination moyen (+ SEM) obtenus pour le groupe contrôle (n=12) et le groupe c-veh (n=12), lors d'une tâche difficile (A) et lors d'une tâche jugée plus facile (B) (données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Les différences statistiques obtenues par des test-t entre les deux groupes sont représentées. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

1.4.1.3. Influence des hormones du cycle œstral sur les effets centraux de la CNA

Les hormones stéroïdiennes (progestérone et œstrogène) régulent des fonctions variées associées au SNC, incluant la régulation des systèmes de neurotransmissions, la connectivité synaptique et la myélinisation. Ainsi, elles sont impliquées dans la modulation des émotions, de l'humeur, des comportements sexuels et sociaux, mais également dans la cognition (Rossetti, Cambiasso et al. 2016). Afin d'évaluer les effets de la CNA sans influence des hormones de la reproduction sur les performances mnésiques lors de nos tests, nous avons réalisé des frottis vaginaux pour déterminer le stade du cycle œstral juste avant la réalisation des tests cognitifs (J0 et J34). Ainsi, le stade du cycle œstral (dioestrus, pro-œstrus, œstrus et metoestrus) a été identifié pour chaque animal. Les performances mnésiques (index de discrimination) obtenues pour chaque jour de test ont été rapportées au stade œstral. Les résultats sont représentés sur la figure 31, où chaque point représente un animal.

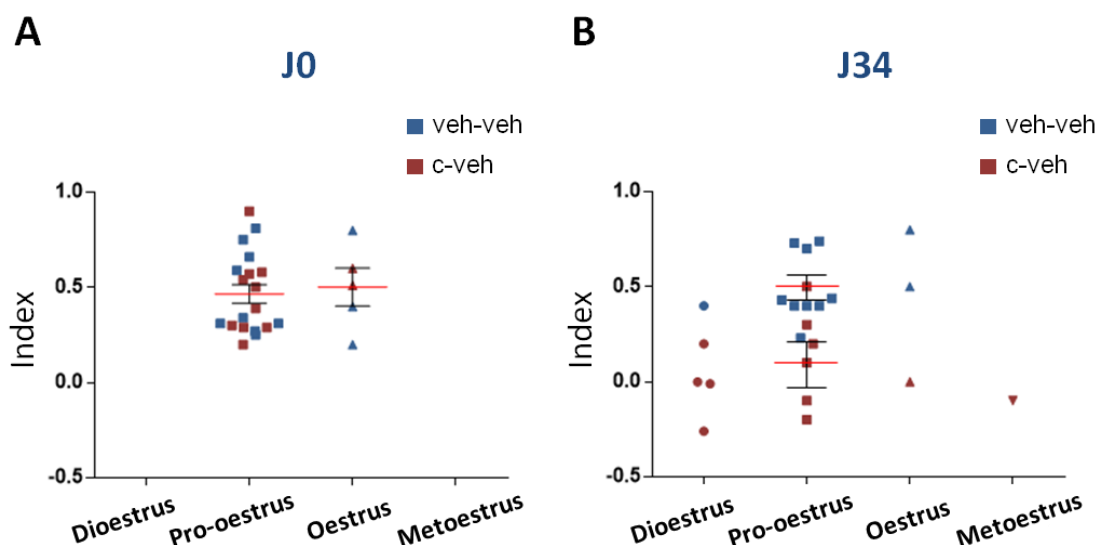


Figure 31 : Distribution des performances mnésiques dans le test « spatial object recognition » des rates en fonction de leur stade du cycle œstral

Les histogrammes montrent la répartition des rates selon le stade du cycle œstral où elles se situent, selon l'index de discrimination obtenu lors des tests cognitifs au jour J0 (A) et J34 (B), chaque point représentant un animal (n=24 ; données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Sur l'histogramme au jour J0 (A), la moyenne ($\pm$ SEM) des performances mnésiques est montrée pour chaque stade du cycle œstral.

Avant le début de tout traitement à J0 (figure 31A), la répartition des rates selon les différents stades du cycle œstral est homogène, avec 80% des animaux (n=19) en pro-œstrus, et 20% en œstrus (n=5). On observe également que les rates en pro-œstrus et en œstrus présentent en moyenne des performances cognitives équivalentes avec des valeurs moyennes de $0,47 \pm 0,05$ et de $0,5 \pm 0,1$ respectivement. On observe également que pour un même stade de cycle, les rates présentent une variation de performance mnésique avec un index minimum de 0,25 et maximum de 0,9 en pro-œstrus, et entre 0,2 et 0,8 en œstrus. Ces données laissent suggérer que le statut hormonal lié au stade de l'œstrus et du pro-œstrus n'influence pas les performances mnésiques obtenues lors du test cognitif.

A la fin de l'expérimentation à J34 (figure 31B), on observe que la répartition des rates selon le stade du cycle œstral est moins homogène par rapport au début de l'expérimentation (J0),

avec 21, 63, 13 et 3% des rates en dioestrus, pro-œstrus, œstrus et metoestrus respectivement. Cependant, l'histogramme révèle que quel que soit le stade du cycle œstral, les animaux ayant suivi le traitement chimiothérapique (points rouge) présentent en moyenne des performances mnésiques inférieures à celles obtenues chez les animaux contrôles (points bleu). De plus, on observe globalement au niveau de ces derniers que quel que soit le stade du cycle, les performances visualisées par l'index de discrimination sont équivalentes et bien supérieures à celles des animaux traités à la CNA. Dans le cas le plus critique (en raison du pic d'œstrogène ; pro-œstrus) les données sont statistiquement significatives ($p < 0,01$). Ensemble, ces données suggèrent que la diminution des performances mnésiques observée dans cette expérience est bien due à un impact négatif de la CNA, indépendamment du statut hormonal des rates lors du test mnésique.

I.4.2. Effet de la CNA sur l'intégrité de la BHE

Le SNC étant isolé et protégé par une barrière protectrice étanche, la BHE, certains auteurs supposent que la chimiothérapie, de façon directe ou non, altère l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de cette barrière protectrice. La BHE ainsi plus perméable, rendrait alors vulnérable certaines populations cellulaires, notamment à division rapide, du SNC à la chimiothérapie directement, ce qui sous-tendrait les troubles cognitifs observés.

I.4.2.1. Effet sur la perméabilité paracellulaire de la BHE

La BHE est une barrière sélective qui contrôle de façon strict les échanges entre le sang et le compartiment cérébral. Le passage paracellulaire de la BHE est modéré, notamment due à la présence de jonctions serrées et adhérentes, dépendantes du cytosquelette des cellules endothéliales qui constituent cette barrière. Etant donné la toxicité bien établie de la chimiothérapie sur les éléments du cytosquelette, en particulier des taxanes dont le docétaxel,

nous avons donné une priorité à évaluer l'étanchéité du passage paracellulaire de la BHE. L'utilisation d'un marqueur de haut poids moléculaire, le bleu Evans, dès le lendemain de la dernière injection de CNA révèle que les animaux du groupe CNA présentent un taux de bleu Evans de 127 ± 4 % au niveau de l'encéphale, et de 134 ± 13 % au niveau de la moelle épinière comparé au groupe contrôle ($p < 0,05$) (figure 32). La CNA induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire de la BHE d'environ 30 %.

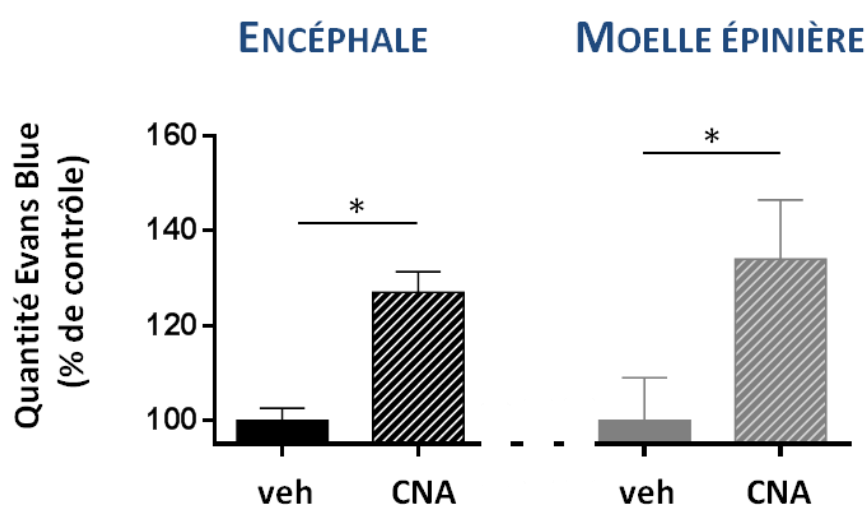


Figure 32 : Effet de la CNA sur le passage paracellulaire de la BHE

Le test du colorant bleu Evans a permis d'évaluer la perméabilité paracellulaire de la BHE. Les quantités moyennes de bleu Evans pour les rats témoins (groupe veh ; $n=3$) et pour les rats ayant reçu la CNA (groupe CNA ; $n=5$), au niveau de l'encéphale (histogramme noir) et de la moelle épinière (histogramme gris), sont exprimées en pourcentage de quantité obtenue chez les rats contrôles (données issues de la cohorte E-Tableau 13). L'utilisation de test Mann-Whitney entre les deux groupes a permis d'analyser les différences statistiques. $*p < 0,05$.

I.4.2.2. Effet délétère de la CNA sur les astrocytes

Parmi les nombreux rôles que jouent les cellules astrocytaires au niveau du SNC, il est connu que ces cellules gliales participent à la constitution de la BHE, en lui fournissant un soutien structurel mais également fonctionnel. A ce titre, nous avons évalué les effets de la CNA sur cette population cellulaire au niveau de l'encéphale, par immuno-marquage fluorescent d'un filament intermédiaire des astrocytes, la GFAP (figure 33). On observe une diminution de près de 40 % de l'intensité moyenne de l'immunofluorescence de la protéine GFAP au niveau de l'hippocampe chez les rats CNA par rapport aux contrôles ($62 \pm 6,39$ et $100 \pm 9,23$ % respectivement ; $p < 0,05$) (Figure 33A et B), et de près de 25 % au niveau du corps calleux ($74,08 \pm 5,24$ % et $100 \pm 5,74$ % ; $p < 0,005$) (figure 33C et D). Ces résultats renforcent l'idée d'une perte de l'intégrité structurale de la BHE suite à la CNA. Ces résultats suggèrent également un déficit de support trophique ou d'autres rôles que jouent les astrocytes au sein de l'encéphale.

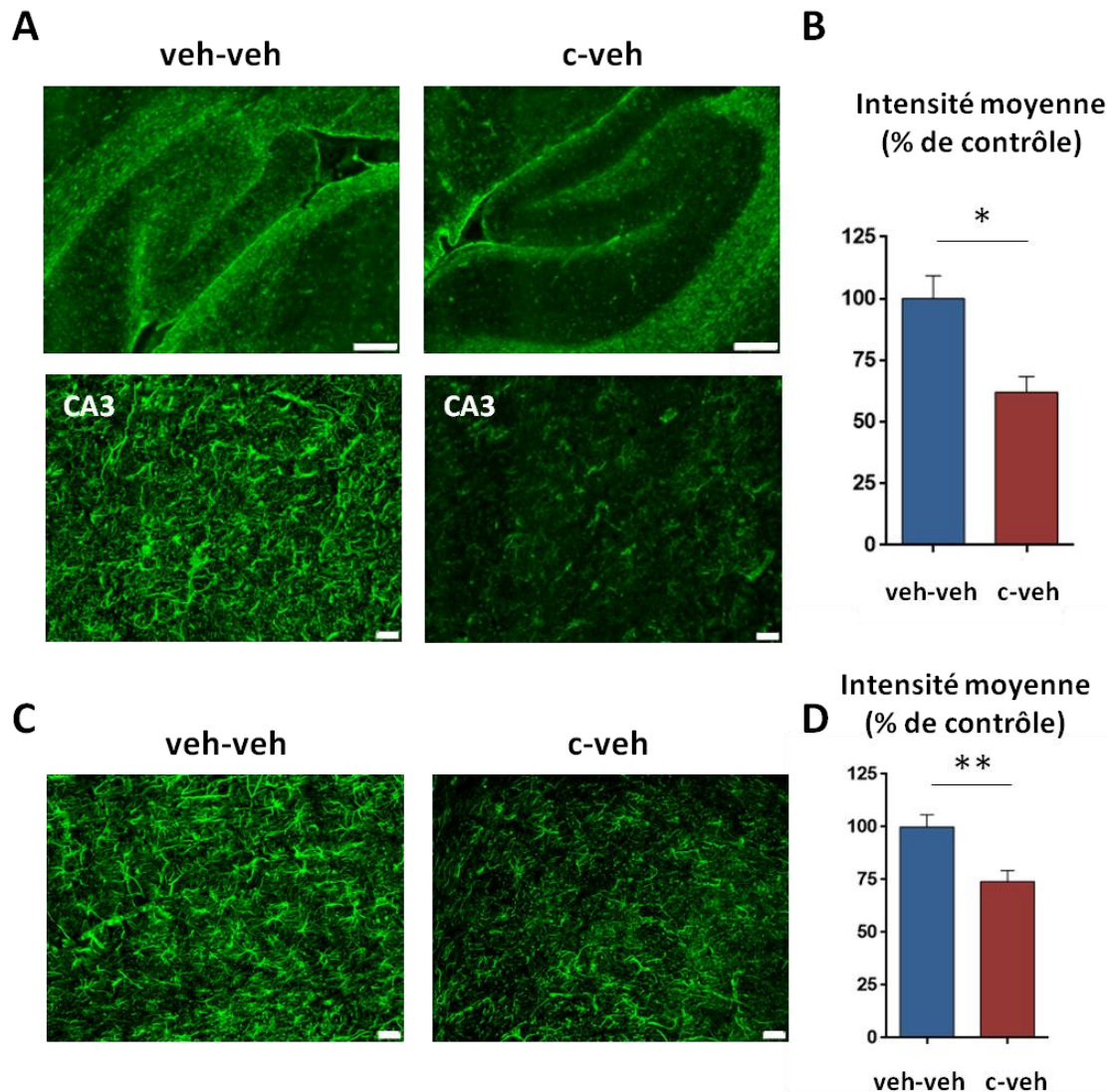


Figure 33 : Effet de la CNA sur l'immunoréactivité de la protéine GFAP au niveau du tissu cérébral

Les histogrammes représentent l'évaluation de l'immunoréactivité de la protéine GFAP au niveau de l'hippocampe (B) et du corps calleux (D). Chaque valeur est exprimée en pourcentage (+ SEM) d'intensité de fluorescence GFAP détectée chez les rats veh-veh. L'analyse comparative de l'intensité moyenne de la protéine GFAP détectée dans les tissus a été effectuée à partir de photomicrographies (A,C) de l'immunofluorescence de la protéine GFAP au niveau de coupes sagittales d'encéphale de rats traités avec le véhicule (groupe veh-veh ; n=12) ou avec la CNA (groupe c-veh ; n=12). Les photomicrographies en (A) représentent l'immunofluorescence de la protéine GFAP au niveau de l'hippocampe (grossissement X4, barre d'échelle 200µm ; grossissement X20 région CA3, barre d'échelle 20µm), et au niveau du corps calleux en (C) (grossissement X20, barre d'échelle 20µm). Les sections cérébrales ont été marquées avec l'anticorps polyclonal GFAP révélé avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa-488 (les données sont issues des cohortes B et C – Tableau 13). Un test-t a été effectué. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

I.4.3. Effet sur les cellules prolifératives cérébrales

Le bénéfice principal de l'utilisation des agents antinéoplasiques pour lutter contre les cellules cancéreuses repose sur une toxicité préférentielle des cellules en prolifération rapide. On peut alors suggérer, dans l'hypothèse où ces drogues atteignent le SNC, soutenue par une altération de la BHE vue plus haut, que les cellules prolifératives au niveau de l'encéphale peuvent être affectées. Nous avons donc dans un premier temps quantifié le nombre de cellules prolifératives grâce à un immuno-marquage fluorescent de la protéine nucléaire Ki-67, marqueur spécifique endogène exprimé uniquement dans les cellules en prolifération active, à tous les stades du cycle cellulaire (Scholzen and Gerdes 2000, Stoeber, Tlsty et al. 2001, Kee, Sivalingam et al. 2002). Parmi les cellules cérébrales à prolifération rapide, les cellules de la lignée oligodendrocytaires, notamment les PO, comptent parmi les cellules du SNC les plus vulnérables à la chimiothérapie (Dietrich, Han et al. 2006, Han, Yang et al. 2008, Bradl and Lassmann 2010). Pour vérifier si la CNA diminue le nombre de cellules PO au sein du tissu cérébral, nous avons réalisé un co-marquage immuno-fluorescent des protéines NG2 (marqueurs des cellules PO) et Ki67 (marqueur de prolifération). Enfin, nous avons comptabilisé le nombre de cellules Ki67 positives – NG2 négatives qui peuvent alors s'apparenter à des cellules souches neuronales impliquées dans le processus de neurogenèse adulte hippocampique.

Au niveau de l'hippocampe (figure 34), On observe que la CNA entraîne une diminution de 50% du nombre de cellules Ki-67 positives, avec un ratio de 0,94 et 1,81% de cellule positive par rapport au nombre total de cellules chez les animaux appartenant au groupe CNA et contrôle respectivement (figure 34A et D). Parmi ces cellules Ki67 positives, on voit que globalement la CNA entraîne une diminution de 80% du nombre de cellules co-

marquées NG2-Ki67 positives au sein de l'hippocampe, avec des valeurs obtenues de $0,94 \pm 0,16$ et $0,18 \pm 0,05$ cellule exprimée en pourcentage du nombre total de cellules pour le groupe veh-veh et c-veh respectivement ($p < 0,01$) (figure 34B et E). Concernant le comptage des cellules NG2⁻-Ki67⁺ (figure 34C), la CNA entraîne une diminution moins drastique mais cependant importante de près de 50% du nombre de cellules Ki67 positives non-NG2, où les valeurs moyennes obtenues ont été de $1,13 \pm 0,22$ et $0,59 \pm 0,07$ cellules exprimées en pourcentage du nombre total de cellules pour le groupe veh-veh et c-veh respectivement ($p < 0,05$).

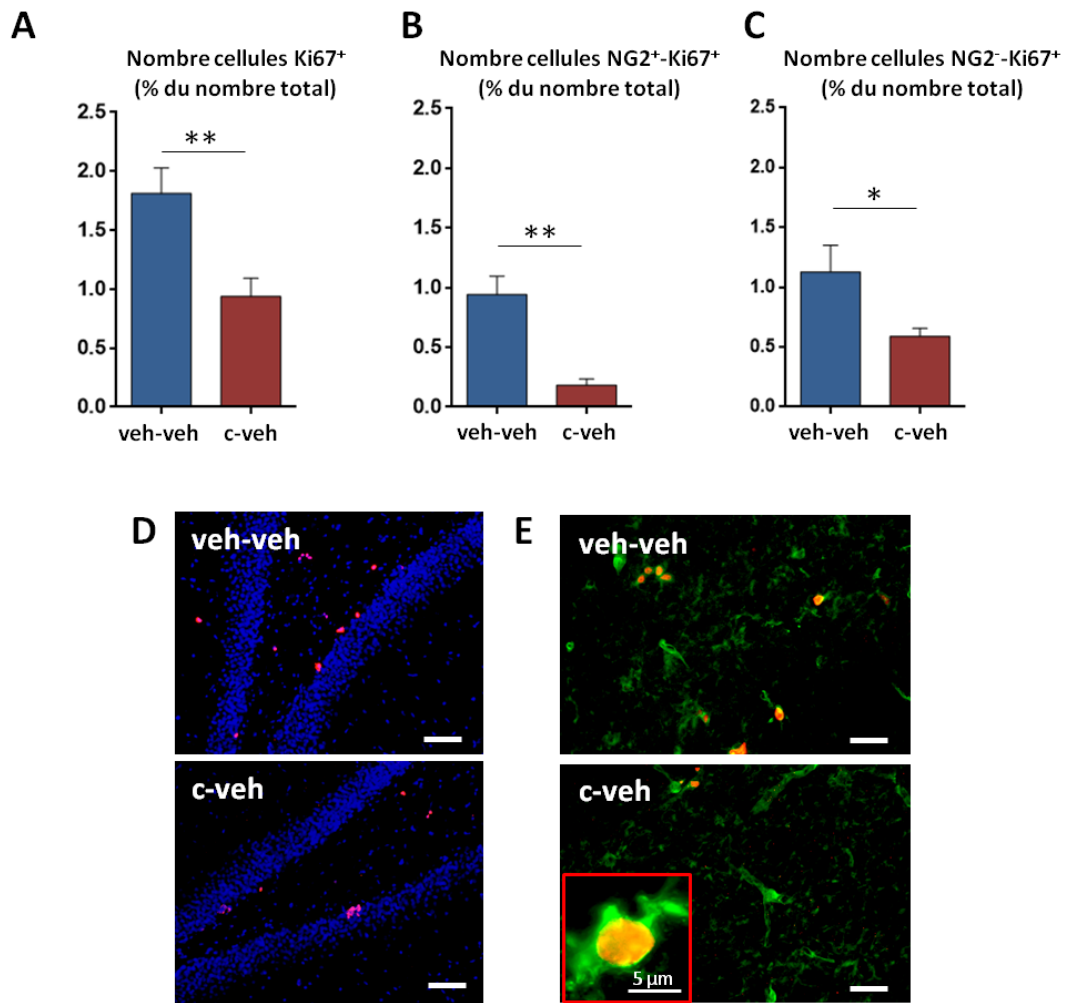


Figure 34 : Effet de la CNA sur le nombre de cellules prolifératives Ki67-positives, Ki67-NG2 positives et Ki67-non NG2 positives au niveau de l'hippocampe

La quantification du nombre total de cellules Ki67-positives, de cellules doublement marquées Ki67-NG2 positives et de cellules Ki67 positives-NG2 négatives au niveau de l'hippocampe a été réalisée par immuno-marquage fluorescent de coupes sagittales d'encéphales de rats contrôles ($n=12$) et de rats traités à la CNA ($n=12$) (les données sont issues des cohortes B et C – Tableau 13). Les coupes cérébrales ont été marquées avec l'anticorps monoclonal anti-NG2 et l'anticorps polyclonal anti-Ki67 révélés avec des anticorps secondaires conjugués à Alexa-488 et Alexa-555 respectivement. Les photomicrographies d'immunofluorescences représentatives montrent le marquage de la protéine Ki67 (D ; barre d'échelle 50 μm) ainsi que le co-marquage Ki67-NG2 (E ; barre d'échelle 20 μm) au niveau du gyrus denté de l'hippocampe des rats recevant le véhicule (groupe veh-veh) ou la CNA (groupe c-veh). Les histogrammes représentent la moyenne (+SEM) de la fraction de cellules Ki67-positifs (A), co-marquées Ki67-NG2 positives (B) et Ki67 positifs NG2 négatives (C) au niveau de l'hippocampe des rats veh-veh et c-veh. L'analyse statistique a été faite par un test-t entre le groupe veh-veh et c-veh. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

La figure 35 illustre les effets de la CNA sur les cellules co-marquées Ki67-NG2 positives (marqueurs des précurseurs oligodendrocytaires prolifératifs) au niveau du corps calleux. Les résultats montrent globalement que la CNA entraîne une diminution de 35% du nombre de cellules NG2-Ki67 positives au sein du corps calleux, avec des ratios moyens de $2,34 \pm 0,16$ pour le groupe veh-veh et de $1,51 \pm 0,11$ pour les rats ayant été traités par la CNA ($p < 0,01$) (figure 35A et B).

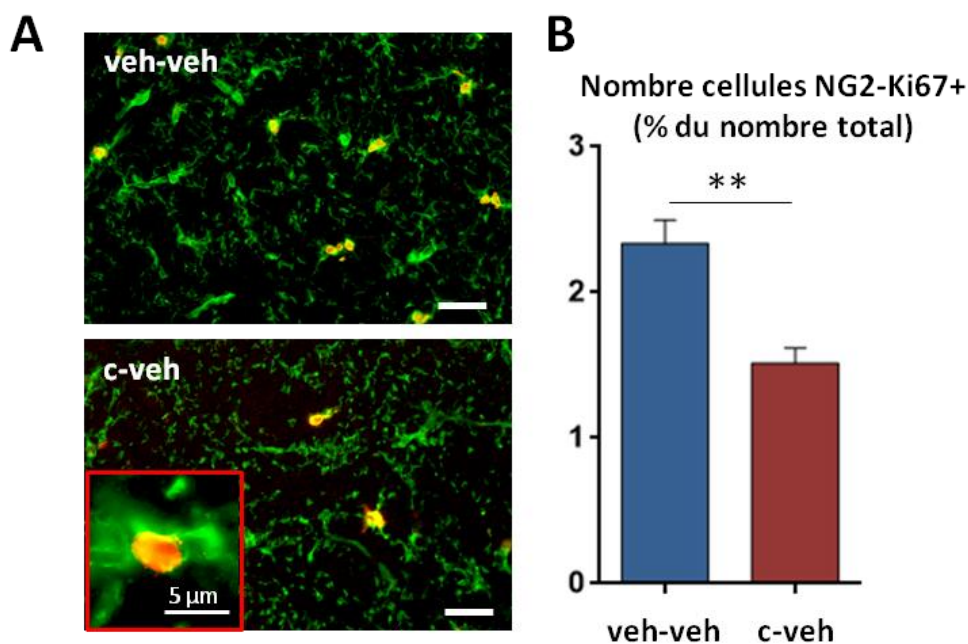


Figure 35 : Effet de la CNA sur le nombre de cellules co-marquées NG2-Ki67 positives au sein du corps calleux

Le co-marquage des cellules NG2-Ki67 illustré en A (barre d'échelle 20µm) a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment (figure 12) ($n=12$ par groupe ; données issues des cohortes B et C – Tableau 13). La quantification est exprimée en pourcentage moyen (+ SEM) de cellules NG2-Ki67 positives du nombre de cellules total (B). Les différences statistiques obtenus par l'application d'un test-t entre les groupes veh-veh et c-veh sont montrés. ** $p < 0,01$.

I.5. CNA et neuro-inflammation

La neuro-inflammation apparaît comme impliquée dans la pathogenèse de la NPCI, et pourrait également sous-tendre les troubles cognitifs observés chez les patients. En effet, des preuves émergentes indiquent que les cytokines pro-inflammatoires faisant suite à la chimiothérapie sont sous-jacentes aux symptômes neuropathiques, notamment en favorisant l'infiltration des macrophages au sein du SNP (Tofaris et al. 2002, Wang, Lehky et al. 2012), mais pourraient également causer une toxicité indirecte et/ou directe au niveau du SNC (Cheung, Lim et al. 2013).

I.5.1. Dosage cytokines pro-inflammatoires sériques circulantes

Nous avons effectué un dosage de cytokines circulantes, comme première approche, pour vérifier une origine périphérique d'une éventuelle neuro-inflammation. Ce dosage a été réalisé une semaine après la fin de la chimiothérapie, par l'utilisation du test BDTM *Cytometric Bead Array*, et nous a permis d'évaluer les concentrations sériques des cytokines pro-inflammatoires IFN et TNF- α , dont les résultats sont représentés sur les histogrammes de la figure 36, et anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 dont les données ne sont pas montrées. En moyenne, les concentrations de l'IFN sérique ont été de $25,77 \pm 0,53$ pg/mL pour les animaux du groupe CNA et de $25,07 \pm 1,35$ pg/mL pour les animaux contrôles (figure 36A). Concernant les concentrations en TNF dans le sérum, les valeurs moyennes ont été de $68,97 \pm 2,24$ pg/mL et de $66,72 \pm 7,75$ pg/mL pour les animaux du groupe CNA et véhicule respectivement (figure 36B). Ici, une semaine après l'arrêt du traitement chimiothérapique, la CNA n'entraîne pas de changement au niveau des concentrations sériques de ces deux cytokines pro-inflammatoires. Concernant les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10, les moyennes se situent respectivement en dessous de 3 et 10 pg/mL. Malheureusement, l'analyse de leur concentration sérique n'a pas été exploitable dans cette étude, présentant des valeurs

bien en dessous de leur seuil de détection par le kit BD™ Cytometric Bead Array de 3,4 pg/mL et 19,4 pg/mL respectivement.

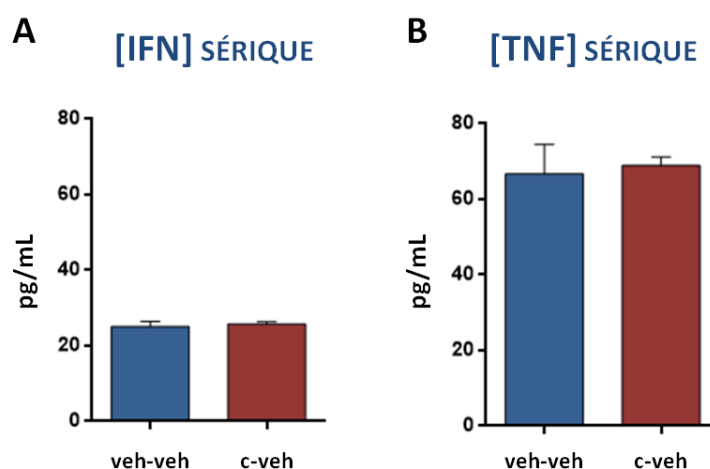


Figure 36 : Quantification par cytométrie de flux des concentrations de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des rats veh ou CNA

Chaque valeur représente la moyenne (+ SEM) de la concentration sérique de l'interféron (IFN) (A) et du facteur de nécrose tumorale (TNF-α) (B) des valeurs obtenues chez les rats contrôles (groupe veh-veh ; n=6) et exposés à la chimiothérapie (groupe c-veh ; n=6) (données issues de la cohorte C – Tableau 13).

I.5.2. Signes d'inflammation au niveau du nerf sciatique

Bien qu'on n'observe pas de modifications des concentrations sériques du TNF-α et de l'IFN, nous avons évalué l'infiltration potentielle des macrophages au niveau du nerf sciatique. Pour ce faire, nous avons d'abord évalué la densité des noyaux cellulaires colorés par le DAPI (Figure 37A et B). Les données montrent un nombre accru de noyaux pour le groupe c-veh ($137,9 \pm 6,3$ % du contrôle ; $p < 0,001$). Ce résultat suggère une infiltration cellulaire induite par la CNA dans le nerf sciatique. Ceci a été confirmé par l'immunomarquage de la protéine CD11b/c, marqueur des macrophages, révélant une augmentation de plus de 5 fois (284 ± 8 comparé au témoin 52 ± 19 cellules/mm²) du nombre de cellules CD11b/c positives dans le nerf sciatique des animaux CNA (figure 37C et D).

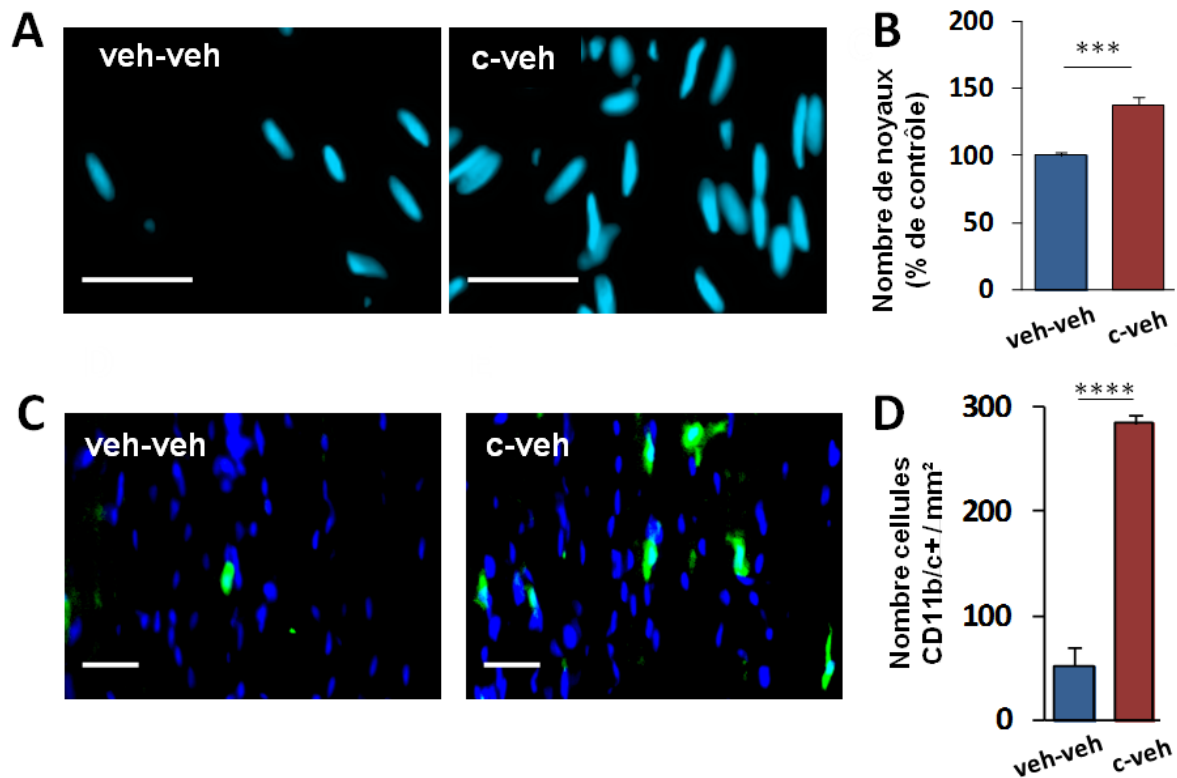


Figure 37 : Infiltration du nerf sciatique par les macrophages induite par la CNA

Quantification du nombre de noyaux cellulaires au sein du nerf sciatique (A, B). (A) Images fluorescentes représentatives des noyaux cellulaires colorés par le 4',6-dianidino-2-phénylindole (DAPI) dans les nerfs sciatiques des rats contrôles (groupe veh-veh ; n=6) et des rats exposés à la CNA (groupe c-veh ; n=6) (barre d'échelle 20 μ m). L'histogramme (B) montre la densité relative des noyaux par unité de surface (SU) (données issues de la cohorte A – Tableau 13). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. L'utilisation du marqueur CD11b/c permet de visualiser et de quantifier le nombre de macrophages présents au niveau des nerfs sciatiques des rats (C, D). (C) Images d'immunofluorescences représentatives de cellules CD11b/c-positives (macrophages) détectées dans les nerfs sciatiques de rats veh-veh (n=6) et c-veh (n=6) (barre d'échelle 20 μ m). L'histogramme (D) montre le nombre de cellules positives CD11b/c quantifiées par mm². Les différences statistiques pour la comparaison entre le groupe c-veh et le groupe témoin sont montrées (test-t : *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Il a été démontré que l'infiltration et l'activation des macrophages au sein du SNP était en lien avec des processus de dédifférenciation ou de reprogrammation des cellules de Schwann où ces dernières répondent par des changements phénotypiques comprenant une surexpression de GFAP (Jessen and Mirsky 2005, Berg et al. 2013, Namgung 2014, Jessen and Mirsky 2016, Lees, Makker et al. 2017). Dans cette étude nous avons observé une augmentation significative de l'immunoréactivité de la protéine gliale fibrillaire GFAP dans le nerf sciatique des rats ayant suivi le traitement CNA par rapport au groupe veh-veh, avec une augmentation moyenne de 164 ± 18 par rapport au contrôle (Figure 38).

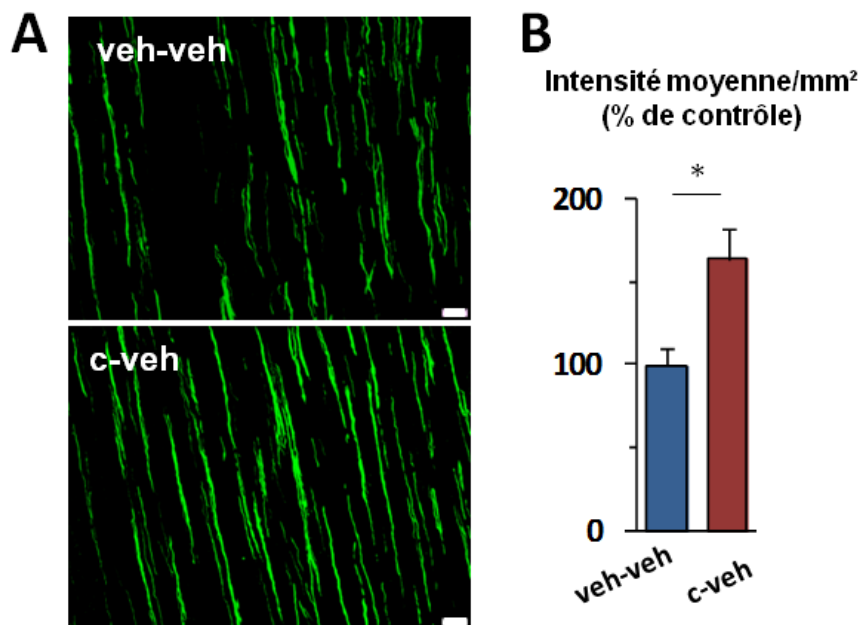


Figure 38 : Effet de la CNA sur l'immunoréactivité de la protéine GFAP au sein des nerfs sciatiques des rats

Un marquage de sections sagittales de nerfs sciatiques avec un anticorps polyclonal anti-GFAP révélé avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa-488 a été effectué. (A) Photomicrographies représentatives d'immunofluorescences de la protéine GFAP marquées dans les nerfs sciatiques des rats contrôles (veh-veh ; n=6) et des rats traités à la CNA (c-veh ; n=6) (barre d'échelle 20 μ m) (données issues de la cohorte A – Tableau 13). L'analyse comparative de l'intensité moyenne de NF200 détectée dans les sections du nerf sciatique est montrée en (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. La comparaison statistique entre les groupes veh-veh et c-veh a été réalisé par l'utilisation d'un test-t. * $p < 0,05$.

I.5.3. Signes d'inflammation au niveau de l'encéphale

Même si les concentrations de cytokines pro-inflammatoires circulantes ne semblent pas changer en réponse à la toxicité de la CNA, nous avons voulu vérifier la présence éventuelle de neuro-inflammation au niveau de l'encéphale. Pour révéler une infiltration du tissu cérébral par des cellules immunitaires, nous avons utilisé un immuno-marquage fluorescent de la protéine CD45, marqueur commun des leucocytes. Le comptage au niveau cortical du nombre de cellules CD45-positives (figure 39) révèle que les animaux ayant suivi le traitement CNA présentent en moyenne 2048 ± 159 cellules CD45-positives par mm^2 , alors que le groupe contrôle présente en moyenne 1054 ± 96 cellules CD45-positives par mm^2 au niveau du cortex frontal ($p < 0,0001$). La CNA entraîne donc chez les rats une augmentation du double de cellules CD45-positives leucocytaires au niveau du SNC.

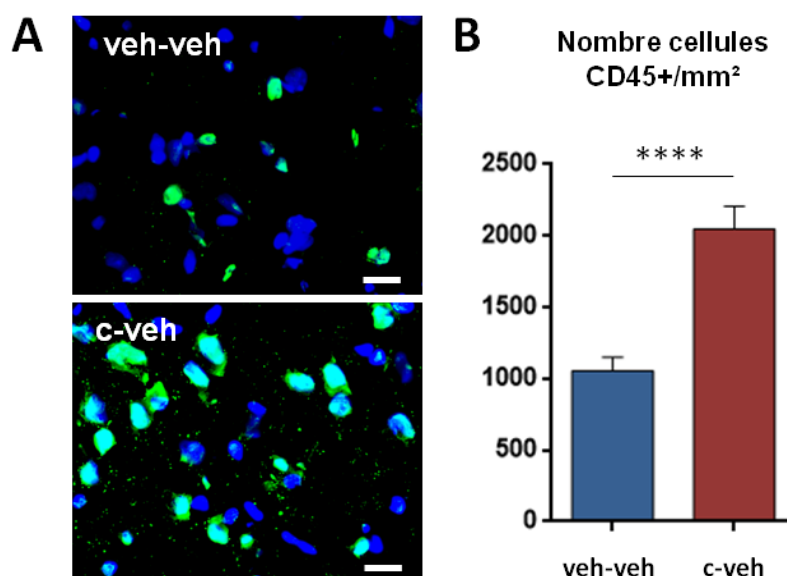


Figure 39 : Effet de la CNA sur l'infiltration de cellules CD45-positives au niveau de l'encéphale

Un marquage de coupes sagittales d'encéphale avec un anticorps polyclonal anti-CD45 révélé avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa-488 a été effectué. (A) Photomicrographies représentatives d'immunofluorescences de la protéine CD45 marquée dans les tissus cérébraux (cortex) des rats contrôles (veh-veh ; $n=12$) et des rats traités à la CNA (c-veh ; $n=12$) (barre d'échelle 20 μm) (données issues des cohortes B et C – Tableau 13). La quantification du nombre de cellules CD45-positives par mm^2 est montrée en (B). L'analyse statistique à l'aide d'un test Mann-Whitney a été réalisée. **** $p < 0,0001$.

CARACTERISATION DU MODELE

EN BREF...

Nous avons produit et caractérisé un modèle préclinique d'atteintes du système nerveux évoqués par un traitement standard de CNA, basé sur l'utilisation d'anthracycline (EPI) suivie de taxane (DO) :

- ✓ Reproduction chez le rat d'une neuropathie périphérique, caractérisée par des douleurs neuropathiques sous-tendues par une axonopathie et une neuro-inflammation au niveau du nerf sciatique.
- ✓ Reproduction chez le rat de troubles mnésiques, caractérisés par une diminution des performances en mémoire spatiale ;
Preuves de modification de l'intégrité de la BHE, caractérisée par une augmentation du passage paracellulaire et des perturbations au niveau des astrocytes ;
Preuves de neurotoxicité envers des populations cellulaires à division rapide (cellules proliférative hippocampiques et précurseurs d'oligodendrocytes).
- ✓ Mise en évidence de l'implication de processus inflammatoires dans la pathogenèse.

II/ Effet de DU, AP et de la combinaison DUAP sur les atteintes périphériques

Le modèle animal ainsi généré et caractérisé nous a permis de tester le potentiel préventif de neuroprotecteurs afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons émis l'hypothèse que la DU pourrait corriger ou empêcher seulement certains paramètres liés à la NPCI, et nous avons donc étudié l'effet concomitant entre la DU et l'AP pour prévenir complètement les symptômes neuropathiques induits par la CNA. En combinant l'action de la DU à d'autres neuroprotecteurs, l'objectif est d'améliorer son efficacité tout en limitant ses effets secondaires.

II.1. Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP sur l'hypersensibilité nociceptive induite par la CNA

II.1.1. Effet sur l'allodynie et l'hyperalgie mécanique CNA-induite

Tous les animaux traités par la CNA développent une allodynie mécanique. Au contraire, lorsque la CNA est accompagnée par un traitement préventif de DUAP (c-DUAP), DU (c-DU) ou AP (c-AP) nous observons une diminution significative du pourcentage de réponse de retrait de la patte suite à l'application du filament de 4 g comparé au groupe c-veh à J34, avec des valeurs de $3 \pm 2\%$ ($p < 0,001$), $12 \pm 3\%$ ($p < 0,05$) et $7 \pm 7\%$ ($p < 0,01$) respectivement contre $28 \pm 9\%$ obtenus pour les animaux c-veh (figure 40A). En considérant la distribution de la sévérité des symptômes (Tableau 14A), il apparaît que 67% et 83% des animaux c-DUAP et c-AP n'ont pas développé d'allodynie mécanique. Les traitements DUAP et AP ont empêché efficacement l'apparition de ce symptôme. En revanche, seulement 17% des animaux c-DU ne développent pas d'allodynie mécanique, alors que le reste des animaux (83%) présente seulement une réduction de sa sévérité (tableau 14A). Ainsi, le traitement DU

a empêché uniquement de façon partielle l'apparition de l'allodynie mécanique induite par la CNA.

En moyenne, les réponses de retrait de la patte suite au filament de 26 g obtenues pour des rats c-DU et c-AP (58 ± 12 et $52 \pm 7\%$ respectivement) ne sont pas significativement différentes par rapport au groupe c-veh ($68 \pm 5\%$) (Figure 40B). Cependant, l'analyse de la distribution de la sévérité des symptômes (Tableau 14B) révèle ici encore une diminution de la gravité des symptômes obtenue avec la DU et l'AP. En effet, alors que 66% des rats c-veh présentent une hyperalgie mécanique de grade 3, seulement 17% des animaux c-DU et aucun des animaux c-AP ont développé une telle gravité d'hyperalgie mécanique. De plus, 33% des rats traités par c-DU et 17% de ceux traités par AP n'ont pas développé le symptôme, alors que tous les animaux c-veh ont eu au moins une hyperalgie de grade 1. Ainsi, le traitement à la DU et à l'AP a partiellement protégé les animaux contre l'installation de l'hyperalgie mécanique induite par la CNA, et a globalement diminué sa sévérité. En revanche, la combinaison DUAP réduit significativement le pourcentage de réponse suite à la stimulation mécanique ($28 \pm 5\%$) par rapport au groupe c-veh ($p < 0,01$) et empêche complètement l'apparition de l'hyperalgie CNA-induite chez tous les animaux (Figure 40B et Tableau 14B).

RESULTATS

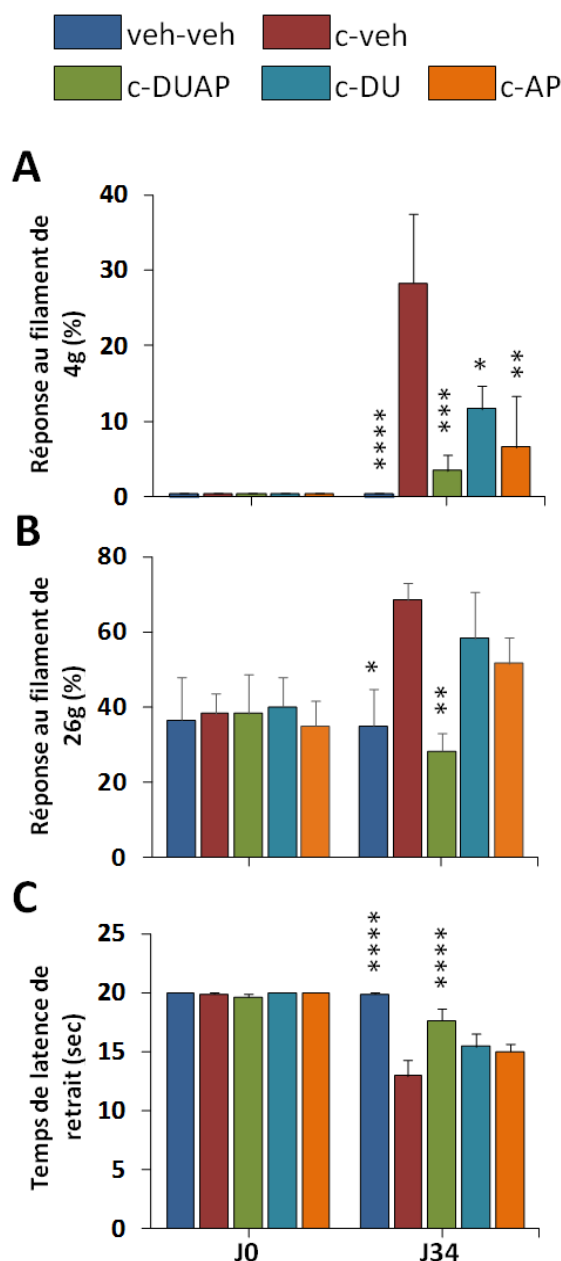


Figure 40 : Effets protecteurs de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre les symptômes de la douleur neuropathique induits par la CNA

Les histogrammes représentent la moyenne (+ SEM ; n = 6 par groupe ; données issues de la cohorte A – Tabelau 13) du pourcentage de réponses de retrait de la patte suite à la stimulation mécanique par le filament de von Frey 4 (A) ou 26 g (B) et suite à la stimulation thermique au froid dans le test à l'acétone (C). Ainsi les effets protecteurs potentiels de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'allodynie mécanique (A), l'hyperalgie mécanique (B) et l'allodynie thermique au froid (C) induites par la CNA ont été évalué. Des tests Kruskal-Wallis ont été effectués, et les différences statistiques significatives entre le groupe c-veh et les autres groupes sont montrées. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Sévérité du symptôme

A	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
veh-veh	100%	-	-	-	-
c-veh	-	50%	17%	-	33%
c-DUAP	67%	33%	-	-	-
c-DU	17%	50%	33%	-	-
c-AP	83%	-	-	17%	-

B	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
veh-veh	100%	-	-	-	-
c-veh	-	17%	17%	66%	-
c-DUAP	100%	-	-	-	-
c-DU	33%	-	50%	-	17%
c-AP	17%	33%	50%	-	-

C	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
veh-veh	100%	-	-	-	-
c-veh	-	-	50%	17%	33%
c-DUAP	33%	50%	-	17%	-
c-DU	-	33%	50%	17%	-
c-AP	-	17%	66%	17%	-

Tableau 15 : Répartition de la sévérité des symptômes douloureux neuropathiques selon le groupe expérimental

La répartition des animaux selon la sévérité de l'allodynie mécanique (A), de l'hyperalgie mécanique (B) et de l'allodynie thermique au froid (C) est représentée et exprimée en pourcentage d'individu (n=6 par groupe ; données issues de la cohorte A – Tableau 13). Les grades 0 à 4 représentent respectivement l'absence, 25, 50, 75 ou 100% de la gravité maximale des symptômes observée pour l'allodynie ou l'hyperalgie.

II.1.2. Effet sur l'allodynie thermique au froid CNA-induite

Ici encore, le traitement par la DU et l'AP ne prévient pas l'apparition de l'allodynie thermique au froid induite par la chimiothérapie. Les latences de retrait des pattes en réponse au dépôt de la goutte d'acétone sont en moyenne respectivement de $15,5 \pm 1,1$ et $15,0 \pm 0,7$ s, qui ne sont pas statistiquement différentes de celles obtenues pour le groupe c-veh ($12,9 \pm 1,4$ s) (figure 40C). Cependant, ici aussi, le traitement par l'AP a réduit la sévérité globale des symptômes par rapport aux rats c-veh (tableau 14C). Fait intéressant, la combinaison DUAP empêche complètement le développement de ce symptôme, avec une latence moyenne obtenue de $17,7 \pm 1,0$ s proche de celle observée dans le groupe veh-veh ($19,9 \pm 0,1$ s) (Figure 40C et Tableau 14C).

En conclusion sur les effets des traitements prophylactiques contre les symptômes nociceptifs de la NPCI, on observe que la DU et l'AP ne présentent qu'une efficacité partielle contre les altérations sensorielles induites par la CNA. En revanche, l'association DUAP permet d'empêcher chez tous les rats l'apparition d'une neuropathie périphérique.

II.2. Effet de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre les altérations du nerf sciatique induites par la CNA

II.2.1. Effet sur les paramètres de conduction

La réduction de l'amplitude maximale du PAN induite par la chimiothérapie est partiellement prévenue par le traitement DU ou AP, bien que les données ne soient statistiquement pas différentes de celles du groupe c-veh ou du groupe veh-veh (figure 41A). En revanche, le traitement combiné DUAP empêche complètement cette réduction induite par la CNA, et une valeur moyenne de $93 \pm 15\%$ du contrôle a été obtenue par rapport à la valeur témoin de $100 \pm 14\%$ (figure 41A).

Concernant la vitesse de conduction, tous les traitements testés (DU, AP et DUAP) préviennent sa diminution par la CNA. Les valeurs moyennes obtenues sont respectivement de 95 ± 4 , 94 ± 3 et $95 \pm 1\%$ du contrôle, similaires au groupe veh-veh ($100 \pm 1\%$), et statistiquement différent de celle obtenue pour le groupe c-veh ($82 \pm 2\%$ du témoin) (figure 41B).

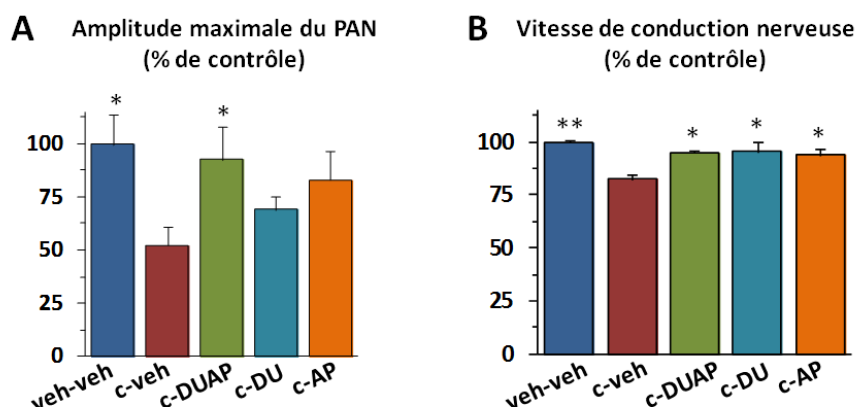


Figure 41 : Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre les altérations du potentiel d'action du nerf sciatique évoquées par la CNA

L'amplitude maximale du PAN (A) et la vitesse de conduction (B) du nerf sciatique ex vivo ont été mesurées à la fin des différents traitements (J34). Chaque valeur est exprimée en pourcentage (+ SEM) par rapport aux valeurs moyennes contrôles ($n = 4$ pour le groupe veh-veh, $n=6$ pour les autres groupes ; données issues de la cohorte A – Tableau 13). Pour la comparaison statistique entre le groupe c-veh et les autres groupes un test Kruskal-Wallis a été utilisé. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

II.2.2. Effet protecteur contre la diminution CNA-induite de la protéine NF200 par la DU, l'AP et de la combinaison DUAP

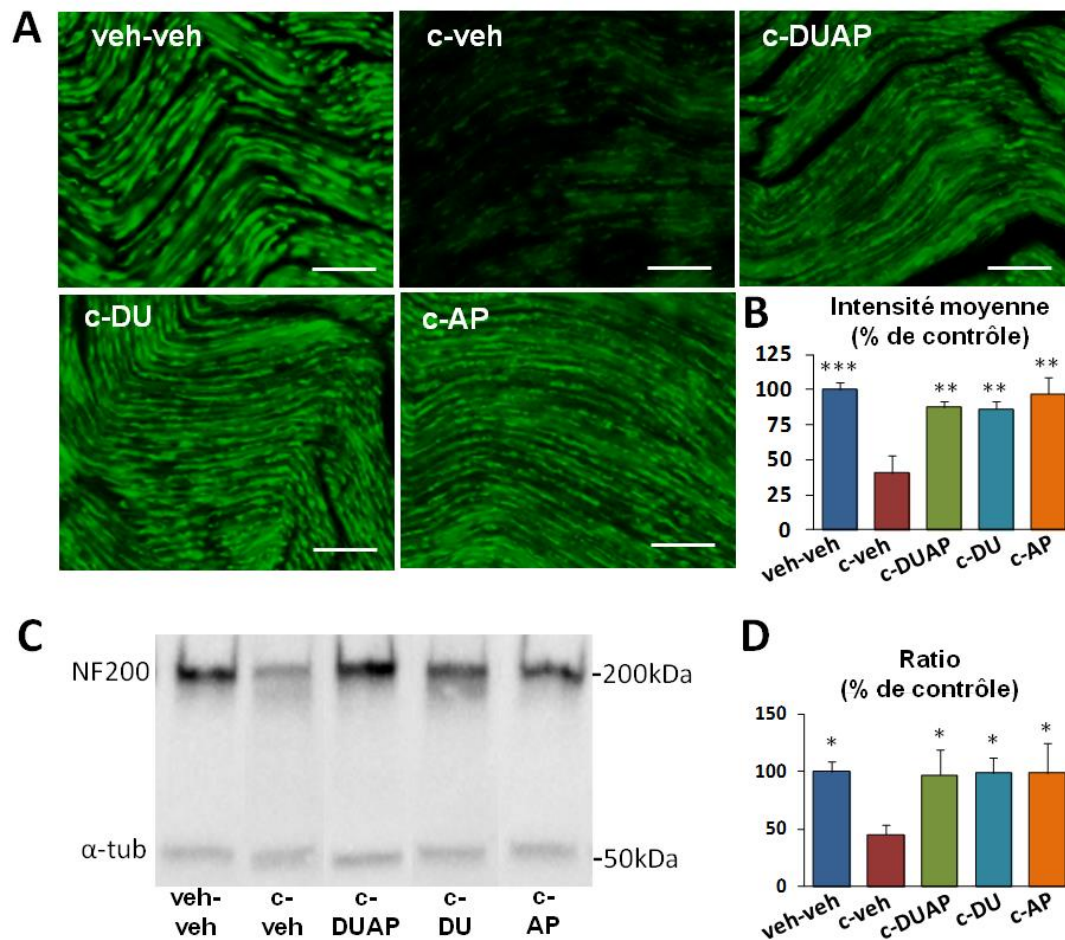


Figure 42 : Effets protecteurs de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre la diminution de NF200 induite par la CNA

Les évaluations de l'immuno-réactivité de la protéine NF200 (A et B) et de son niveau d'expression (C et D) au niveau du nerf sciatique des rats ont été réalisées en fin d'expérience (n=6 par groupe ; données issues de la cohorte A – Tableau 13). Les photomicrographies du marquage immunofluorescent de la protéine NF200 (A) ont été réalisées sur des coupes sagittales de nerf sciatique (barre d'échelle 20 µm), et ont permis de quantifier l'intensité moyenne obtenue pour chaque groupe, exprimée en pourcentage du contrôle (B). Le niveau d'expression de la protéine NF200 dans l'extrait protéique de nerf sciatique a été analysé par la technique de Western blot (C) (α-tub : α-tubuline). L'histogramme (D) montre les moyennes normalisées (+ SEM) obtenues pour les différents groupes d'animaux. Les différences statistiques, déterminées par un test ANOVA à un facteur, pour la comparaison entre le groupe c-veh et les autres groupes expérimentaux sont montrées. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

De manière intéressante, les animaux traités avec la combinaison DUAP, DU ou AP présentent une immunoréactivité de la protéine NF200 dans le nerf sciatique respectivement de 88 ± 5 , 86 ± 5 et $97 \pm 12\%$ du groupe contrôle, statistiquement différentes de la valeur du groupe c-veh ($41 \pm 12\%$, $p < 0,01$) (Figure 42A et 42B). On observe des effets similaires (97 ± 22 , 99 ± 14 et $99 \pm 26\%$ du contrôle respectivement) par l'analyse par Western blot de cette même protéine (Figure 42C et 42D). Ces résultats montrent un niveau de protéine NF200 comparable à celui du groupe témoin (groupe veh-veh), et sont statistiquement différents des animaux c-veh ($45 \pm 9\%$; $p < 0,05$).

II.3. Effet de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP sur l'inflammation CNA-induite au niveau du nerf sciatique

Sur la figure 43, les données montrent un nombre accru de noyaux cellulaires colorés par le DAPI pour les groupes c-veh et c-DU ($137,9 \pm 6,3\%$ et $132 \pm 6,7\%$ du groupe témoin respectivement ; $p < 0,001$ et $p < 0,01$). En revanche, les rats traités par la combinaison DUAP ou par l'AP ne présentent pas de différence significative avec le groupe témoin ($102,6 \pm 5,3\%$ et $107,5 \pm 5,6\%$ du groupe veh-veh respectivement). Cette augmentation du nombre de noyaux est due au moins en partie à un accroissement significatif du nombre de cellules CD11b/c positives qui est efficacement contrecarré par l'AP et la combinaison DUAP, mais pas par le traitement à la DU seule. Les valeurs moyennes obtenues étaient respectivement de 86 ± 24 , 49 ± 6 et 205 ± 14 cellules/mm² (figure 44). Ces résultats suggèrent que la DU seule ne permet pas de prévenir l'infiltration cellulaire induite par la CNA, alors que ce processus est empêché par l'AP et la combinaison DUAP. Concernant l'augmentation de l'immunoréactivité de la GFAP dans le nerf sciatique induite par la CNA, les rats c-DUAP ($84 \pm 6\%$) et c-AP ($81 \pm 8\%$) ne montrent aucune différence statistique avec le groupe témoin (figure 45A et B), alors que les animaux c-DU présentent une valeur moyenne de $130 \pm 21\%$ similaire à celle obtenue chez groupe c-veh.

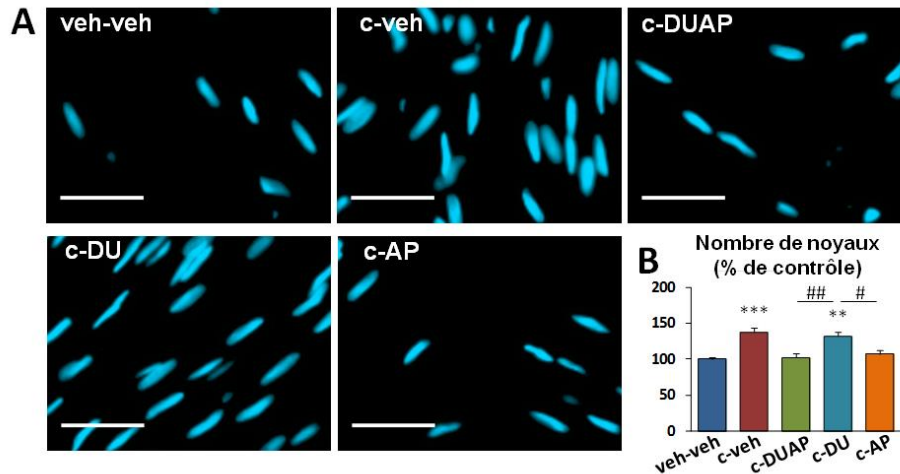


Figure 43 : Effets protecteurs de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'augmentation du nombre de noyaux cellulaires dans le nerf sciatique

Le marquage des noyaux cellulaires par le 4', 6-dianidino-2-phénylindole (DAPI) dans les nerfs sciatiques des rats exposés ou non aux différents traitements a été réalisé (A) (barre d'échelle 20µm). La quantification de la densité relative des noyaux colorés par DAPI, exprimée en pourcentage du nombre de noyaux moyen retrouvé dans les sections de nerfs sciatiques des rats contrôles (groupe veh-veh), est représentée sur l'histogramme (B) (n=6 par groupe ; données issues de la cohorte A – Tableau 13). Les différences statistiques pour la comparaison avec le groupe témoin sont montrées et obtenues par un test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Fisher, avec ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. La comparaison entre les groupes c-DU et c-AP ou c-DUAP est représentée par #, avec # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

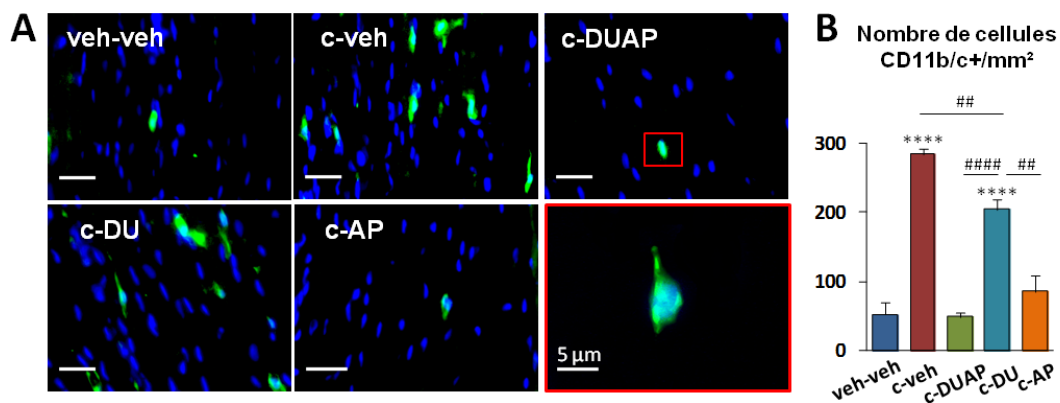


Figure 44 : Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'infiltration cellulaire du nerf sciatique : nombre de cellules CD11b/c positives

Des images représentatives d'immunofluorescences des cellules CD11b/c positives (macrophages) détectées dans les nerfs sciatiques sont montrées en (A) (barre d'échelle 20 µm). L'histogramme (B) montre le nombre de cellules positives CD11b/c comptées par mm² (n=6 par groupe ; données issues de la cohorte A – Tableau 13). Un test de Kruskal-Wallis a été effectué. **** $p < 0,0001$ comparé à un groupe de veh-veh ; ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$.

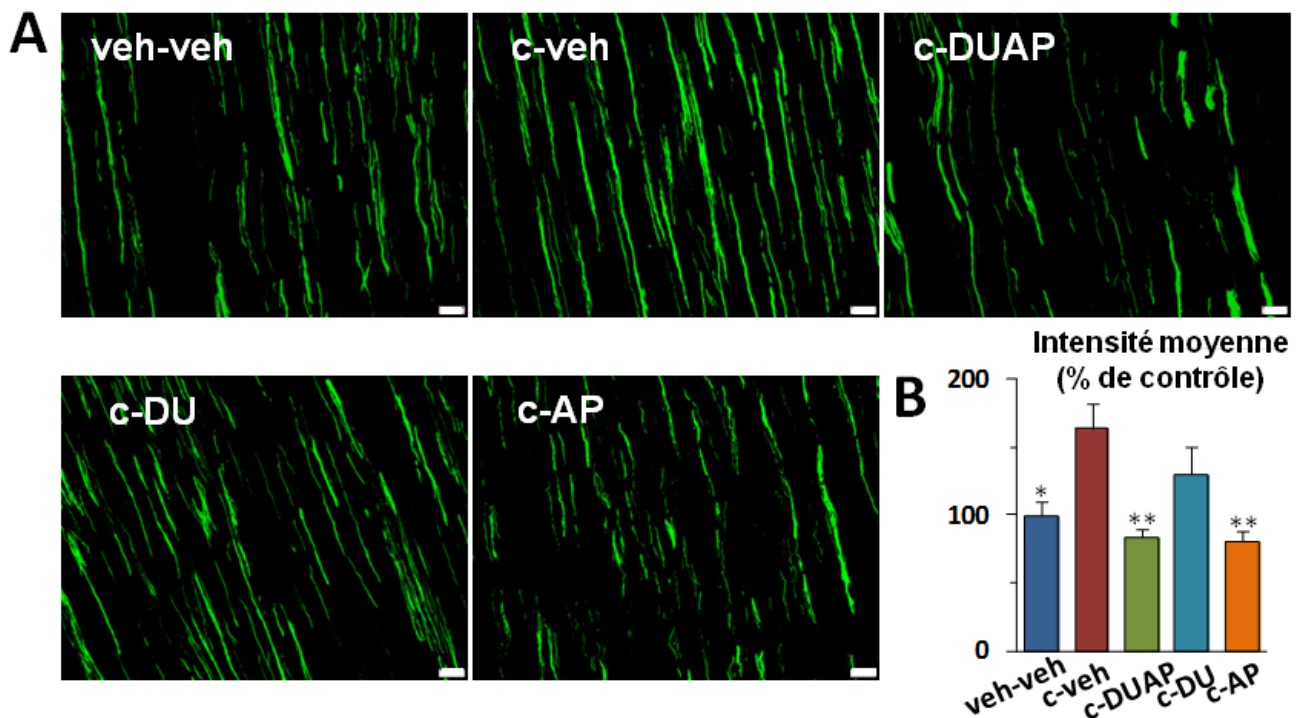


Figure 45 : Effets de la DU, de l'AP et de la combinaison DUAP contre l'augmentation de l'immunoréactivité de la protéine GFAP des cellules de schwann au niveau du nerf sciatique

Les images d'immunofluorescences (A) représentent la protéine GFAP marquée dans des coupes de nerfs sciatiques (barre d'échelle 20 μ m). L'histogramme (B) montre l'intensité moyenne (+ SEM) de l'immunofluorescence obtenue pour chaque groupe d'animaux (n=6 par groupe ; données issues de la cohorte A – Tableau 13). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. Les différences statistiques, obtenues par un test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey, pour la comparaison avec le groupe c-veh sont montrées. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

EFFET DE DU, AP ET DE LA COMBINAISON DUAP SUR LES ATTEINTES PERIPHERIQUES

EN BREF...

Les résultats comportementaux démontrent un effet préventif, contre les altérations sensorielles induites par la CNA, contrasté de la combinaison DUAP comparé à l'AP ou la DU seul :

- ✓ Efficacité partielle de la DU et de l'AP ;
- ✓ Efficacité complète de la combinaison DUAP.

Les études fonctionnelles et biochimiques révèlent que :

- ✓ DU, AP et DUAP empêchent l'altération du cytosquelette évoquée par la CNA dans les axones du nerf sciatique ;
- ✓ En revanche, la neuro-inflammation suggérée par l'infiltration de cellules immunitaires au niveau du nerf sciatique observée suite à la CNA est prévenue par la combinaison DUAP et l'AP, mais pas par la DU seule.

III/ Effet de la DU sur les atteintes centrales

Nous avons vu que la DU exerce des effets positifs sur différents domaines de la cognition qui sont altérés chez les patients atteints de trouble dépressif majeur, et que plusieurs études suggèrent un effet neuroprotecteur de la DU dans différents modèles de lésions cérébrales (voir Introduction, partie V.2.3 p113). Il existe également des preuves d'un lien entre antidépresseurs, notamment bien étudié avec la fluoxétine, et la neurogenèse hippocampique adulte. Ces données laissent à penser que la DU pourrait être bénéfique dans le traitement du *chemobrain*. A ce jour, aucune étude clinique ou préclinique n'évalue les effets potentiels de la DU dans la prise en charge des troubles cognitifs chimio-induits. Nous avons donc cherché à évaluer le potentiel neuroprotecteur de la DU sur le déclin des performances cognitives induit par la CNA. Nous avons réalisé une relation dose-réponse en utilisant différents dosages de DU, à savoir 1, 2, 4 et 8 mg/kg/injection.

III.1. Toxicité de la DU à 8mg/kg

III.1.1. Toxicité additive de la DU à 8 mg/kg sur le poids des animaux

Sur la figure 46, on retrouve la variation de poids des animaux tout au long de l'expérimentation. Le poids en gramme a été normalisé et rapporté en pourcentage du poids initial. On voit que les animaux veh-DU4 ont un accroissement linéaire tout au long de l'expérimentation, pour atteindre à J34 un poids de 140 % par rapport à leur poids initial, identique au groupe contrôle. La DU à 4mg/kg, n'affecte pas la prise de poids normale chez les animaux.

En revanche, si aux doses 1, 2 ou 4 mg/kg la DU ne change pas la perte de poids induite par la CNA, le dosage de 8 mg/kg aggrave celle-ci de manière significative à partir de J30 ($p < 0,05$). Ceci sans réversion après l'arrêt de la CNA comme observé pour les autres doses de DU et stagne en moyenne à 95 % ($p < 0,05$). Ces résultats suggèrent que la DU, en particulier à forte

dose (8mg/kg ici), devient morbide concernant la prise de poids pour les rats lorsqu'elle est en association à la CNA.

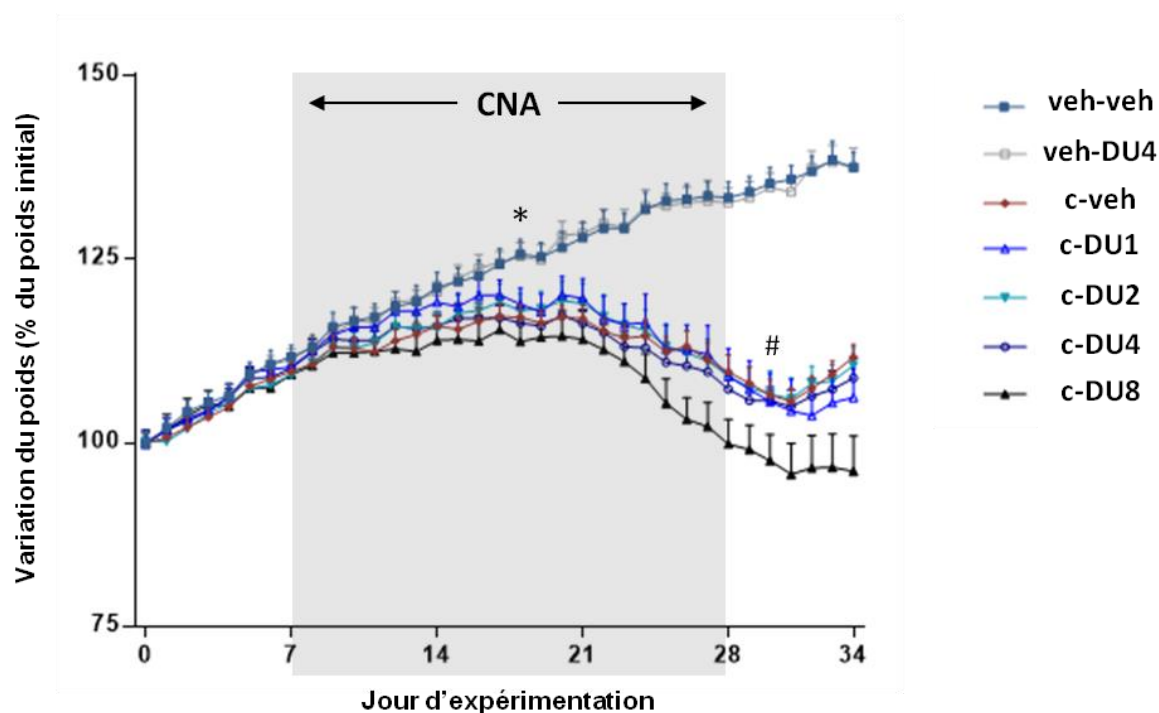


Figure 46 : Effet de DU sur la cinétique de la variation du poids des rats contrôles ou traités à la CNA

Le poids a été mesuré quotidiennement chez les rats témoins (groupe veh-veh ; n=12), recevant la DU4 (veh-DU4 ; n=6), la CNA seule (groupe c-veh ; n=12), la CNA plus différentes doses de DU (groupes c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 ; c-DU8, n=6) (données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Les traitements DU ont été administrés tous les deux jours à partir de J0 jusqu'à J28, et la CNA a débuté à J7. Chaque valeur représente la moyenne (+ SEM) du poids exprimé en pourcentage du poids initial. Le test statistique utilisé est un ANOVA à deux facteurs, suivi d'un test post-hoc de Tukey, pour une comparaison entre les groupes traités à la CNA et ceux recevant le véhicule (* $p < 0,05$) ou entre le groupe c-DU8 et les autres groupes recevant la CNA et la DU à 1, 2 ou 4 mg/kg (# $p < 0,05$).

III.1.2. Effet de la DU sur la survie des animaux

Dans cette étude, des critères pour la décision de l'euthanasie ont été mis en place (état d'amaigrissement important, dos rond et poil hérissé, léthargie) afin de stopper l'expérimentation pour les animaux en souffrance inutile, suivant les règles éthiques.

Sur la figure 47 représentant la cinétique du taux de survie, on peut observer que, malgré l'effet délétère de la CNA sur le poids des animaux, le traitement n'entraîne pas de décès ou d'état nécessitant l'arrêt de l'expérimentation chez les animaux durant les 5 semaines d'expérimentation. Il en est de même pour la DU à 1, 2 ou 4mg/kg associée à la CNA, ou la DU à 4 mg/kg seule (groupe veh-DU4) (figure 47). En revanche, à partir de J31 (3 jours après la fin des traitements) on observe une diminution de moitié de l'effectif des animaux constituant le groupe c-DU8 (soit 3 animaux). A J32, on constate la perte d'un quatrième animal, puis le taux de survie atteint 0 % à J34, avant de pouvoir réaliser les derniers tests comportementaux (figure 47). C'est d'ailleurs à ce titre que les effets neuroprotecteurs potentiels de la DU à 8 mg/kg n'ont pas pu être évalués.

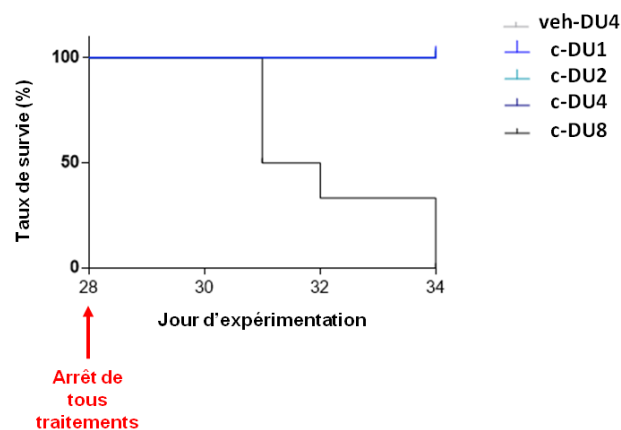


Figure 47 : Effet des différentes doses de DU combinées à la CNA sur le taux de survie des animaux

L'évolution du taux de survie des rats est montrée à partir de J28, qui correspond au dernier jour d'administration de la CNA et des différents traitements thérapeutiques. La médiane de survie est J31 pour le groupe c-DU8, alors que tous les autres groupes restent à leur effectif de départ (données issues des cohortes B et C – Tableau 13).

III.2. Effet de la DU sur les troubles mnésiques CNA-induits

La figure 48 représente les index de discrimination obtenus en moyenne pour chaque groupe, lors d'une tâche difficile (déplacement de 20 cm, figure 48A) et lors d'une tâche facile (déplacement de 30 cm ; figure 48B). Les animaux du groupe veh-DU4 présentent en moyenne un index de $0,47 \pm 0,11$ pour un déplacement de 20 cm, et de $0,45 \pm 0,09$ pour un déplacement de 30 cm. Les performances moyennes de ces rats sont identiques à celles obtenues pour le groupe contrôle (veh-veh), où les valeurs sont de $0,51 \pm 0,06$ et $0,50 \pm 0,06$ pour une tâche difficile et facile respectivement. Quelque soit la difficulté de la tâche ici, la DU à 4 mg/kg (groupe veh-DU4) n'entraîne pas d'effet sur les performances mnésiques en comparaison au groupe contrôle (veh-veh).

Pour une tâche jugée facile (figure 48B), à partir d'une dose de 2mg/kg la DU est efficace pour prévenir le déclin des performances de la mémoire spatiale induit par la CNA chez les rongeurs. En effet, les groupes c-DU2 et c-DU4 présentent des index de discrimination en moyenne de $0,48 \pm 0,07$ et $0,45 \pm 0,1$ respectivement, similaires au groupe contrôle veh-veh ($0,50 \pm 0,06$). A l'inverse, une dose de 1 mg/kg de DU ne permet pas de prévenir cette diminution des capacités cognitives lors de ce test, puisque les rats présentent un index de $0,09 \pm 0,03$ statistiquement différent du groupe contrôle veh-veh ($p < 0,05$), et qui est équivalent aux performances observées chez le groupe c-v ($0,10 \pm 0,08$).

Lorsque la tâche est au seuil de discrimination pour des rats sains, et donc plus compliquée (déplacement de 20 cm ; figure 48A), on observe de façon intéressante une prévention sur l'apparition des troubles cognitifs CNA-induits qui s'avère être dose-dépendante de la DU. Alors que la DU à 1mg/kg reste toujours inefficace (index de $-0,04 \pm 0,10$; $p < 0,01$), la DU à 2mg/kg (index de $0,19 \pm 0,05$), même si significativement plus faible que le groupe veh-veh ($p < 0,05$) semble prévenir de façon partielle le déclin des performances mnésiques. Par contre, la DU à une dose de 4 mg/kg permet de prévenir efficacement et de façon totale cette

diminution des performances de la mémoire spatiale induite par la CNA, avec un index moyenne de $0,37 \pm 0,09$, non différent de celui du groupe contrôle.

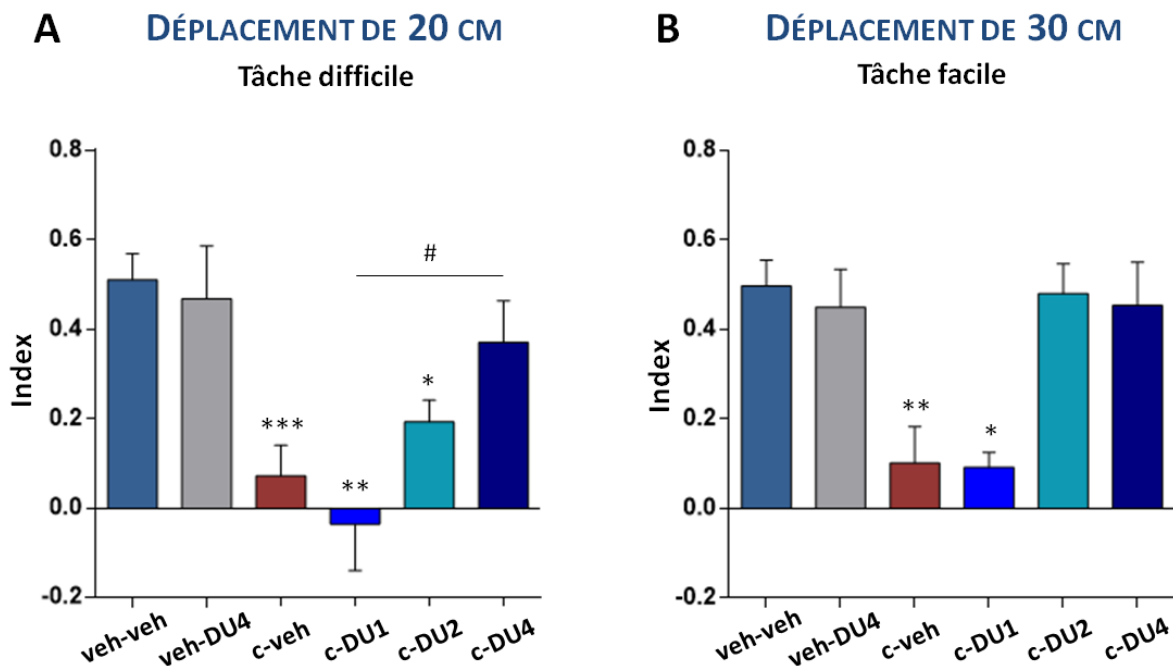


Figure 48 : Effet protecteur de la DU sur la perte CNA-induite des performances mnésiques des rats

Les capacités de la mémoire spatiale ont été évaluées par le test du Spatial object recognition. Les données correspondent aux performances cognitives obtenues en fin d'expérimentation (J34). Les histogrammes montrent les index de discrimination moyens (+ SEM) obtenus lors d'une tâche difficile (A) et lors d'une tâche jugée plus facile (B) (groupe veh-veh, n=12 ; veh-DU4, n=6 ; c-veh, n=12 ; c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 ; c-DU8, n=6 / données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Les différences statistiques obtenues par un test ANOVA à un facteur suivi par un test post-hoc de Tukey sont représentées. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ pour la comparaison au groupe veh-veh ; # $p < 0,05$.

III.3. Effet contre la diminution de l'immunoréactivité de la protéine GFAP des astrocytes induite par la CNA

Nous avons évalué les effets neuroprotecteurs potentiels de la DU sur les altérations des cellules astrocytaires induite par la CNA, notamment sur la diminution de l'immunoréactivité de la protéine GFAP. Les résultats obtenus au niveau de l'hippocampe et du corps calleux sont représentés en pourcentage d'intensité du marquage GFAP par rapport au groupe contrôle (veh-veh) sur les figures 49 et 50.

Les animaux du groupe veh-DU4 présentent une intensité moyenne de $92,2 \pm 11,3$ % au niveau de l'hippocampe et de $99 \pm 7,1$ % au niveau du corps calleux. Ces moyennes sont équivalentes à celles observées chez le groupe contrôle, et significativement différentes de celles obtenues chez le groupe c-veh ($62 \pm 6,4$ % et $74,1 \pm 5,2$ % respectivement ; $p < 0,05$). Quel que soit la dose testée, on observe que la DU permet de prévenir de façon efficace la diminution de l'immunoréactivité de la GFAP évoquée par la CNA. Les intensités moyennes pour les groupes c-DU1, c-DU2 et c-DU4 au niveau de l'hippocampe sont respectivement de $96,9 \pm 7,3$ %, $86,4 \pm 7,1$ % et $97,3 \pm 11,4$ % par rapport au groupe veh-veh, statistiquement différent du groupe CNA ($62,0 \pm 6,4$ % ; $p < 0,05$). On retrouve la même tendance au niveau du corps calleux, où les valeurs de l'intensité moyenne par rapport aux contrôles sont de $99,4 \pm 10,3$ %, $100,9 \pm 10,5$ % et $108,4 \pm 7,8$ % respectivement pour les groupes c-DU1, c-DU2 ($p < 0,05$ comparés au groupe c-veh) et c-DU4 ($p < 0,001$ en comparaison au groupe c-veh). Ces résultats suggèrent une action neuroprotectrice, et de façon intéressante même à faible dose (1 mg/kg) de la DU sur les cellules gliales astrocytaires contre la neurotoxicité induite par la CNA.

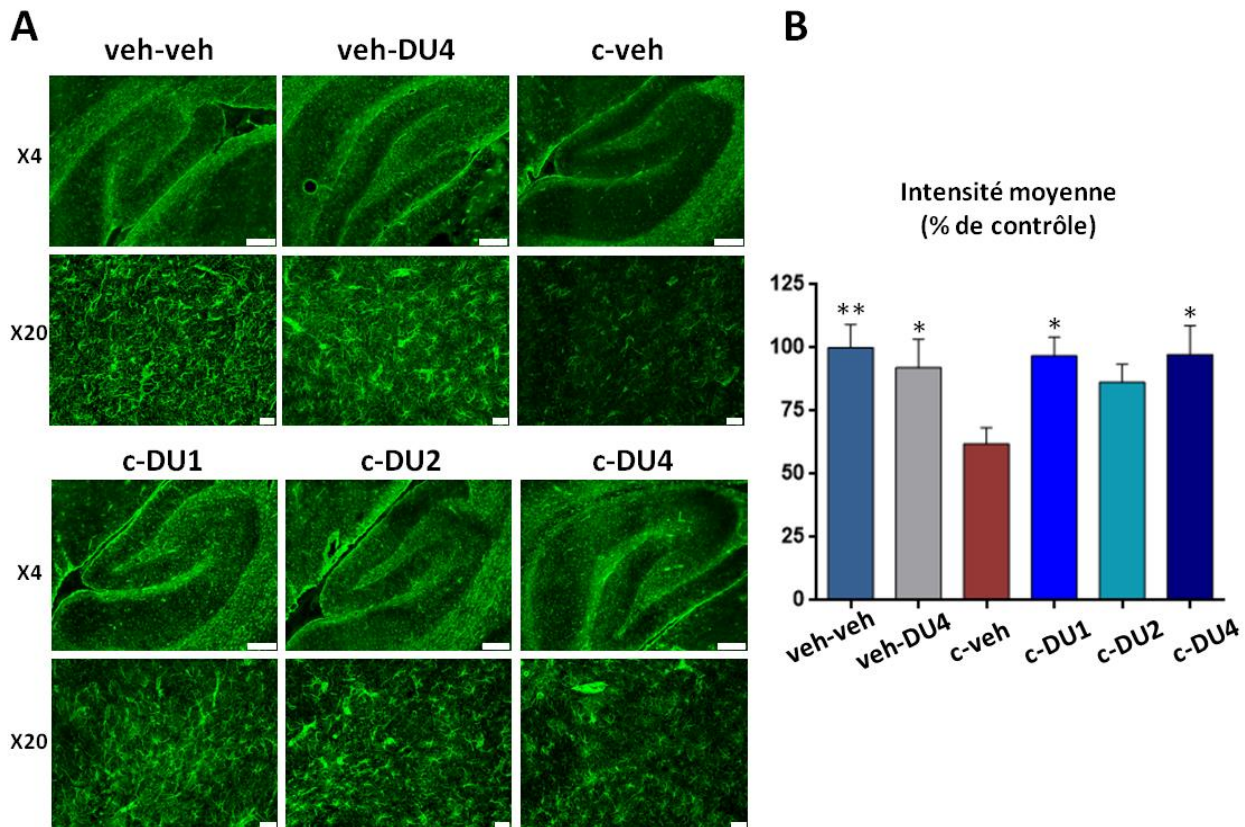


Figure 49 : Effet protecteur de la DU sur la diminution de l'immunoréactivité de la GFAP induite par la CNA dans l'hippocampe

Les photomicrographies en (A) représentent l'immunofluorescence de la protéine GFAP au niveau de l'hippocampe (grossissement X4, barre d'échelle 200 μ m ; grossissement X20 région CA3, barre d'échelle 20 μ m). L'histogramme (B) représente la quantification de l'immunoréactivité de la protéine GFAP au niveau de l'hippocampe. Chaque valeur est exprimée en pourcentage (+ SEM) d'intensité de fluorescence détectée chez les rats veh-veh (groupe veh-veh, n=12 ; veh-DU4, n=6 ; c-veh, n=12 ; c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 / données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Un test ANOVA à un facteur a été effectué, et les différences statistiques entre le groupe c-veh et les autres groupes sont montrées. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

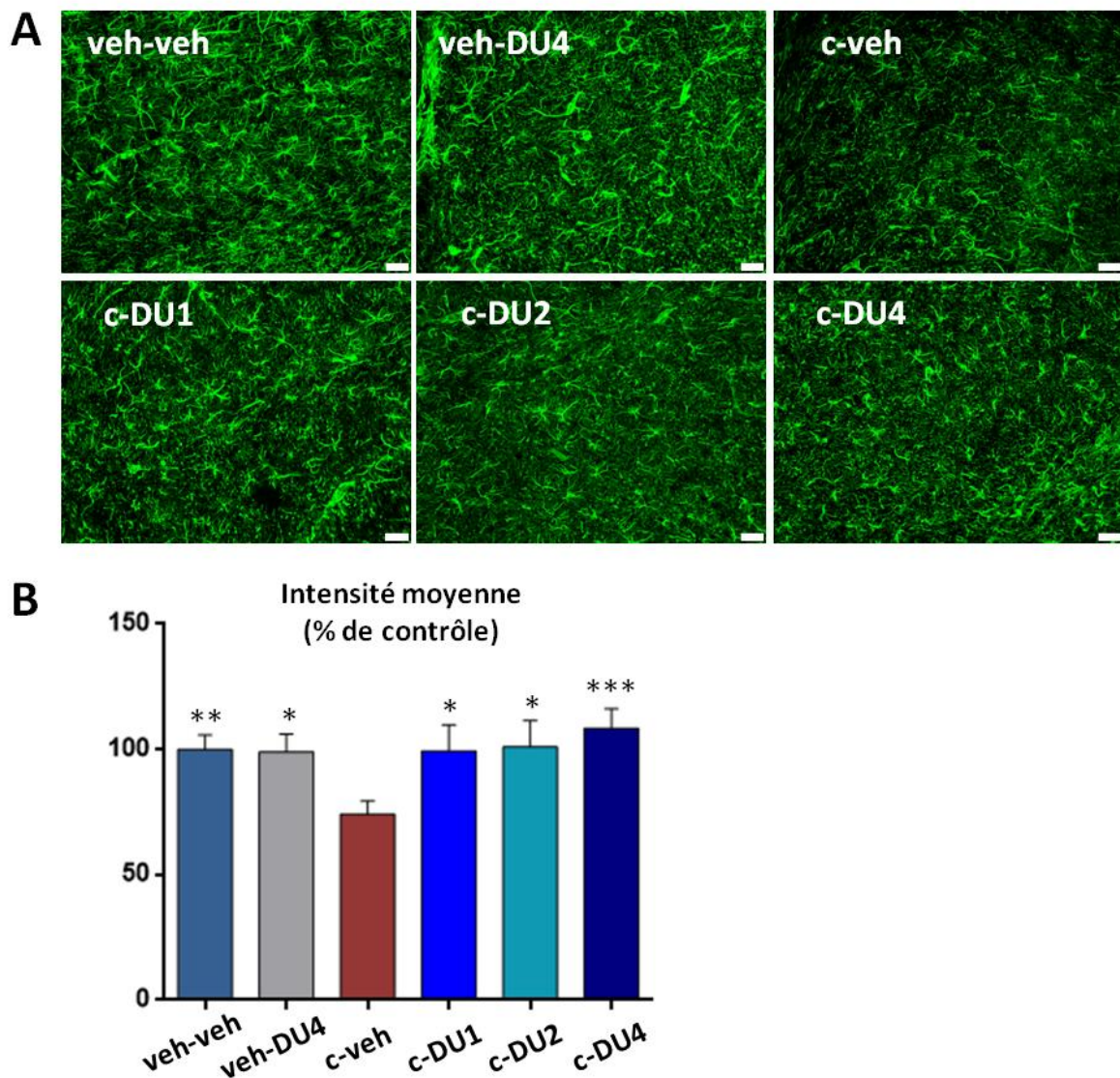


Figure 50 : Effet protecteur de la DU sur la diminution CNA-induite de l'immunoréactivité de la protéine GFAP dans le corps calleux

Les photomicrographies représentatives (A) montrent l'immunofluorescence de la protéine GFAP au niveau du corps calleux (grossissement X20, barre d'échelle 20 μ m obtenus pour chaque groupe expérimental). L'analyse comparative de l'intensité moyenne de la protéine GFAP détectée dans les tissus est illustrée par l'histogramme (B). Chaque valeur est exprimée en pourcentage (+ SEM) du contrôle (groupe veh-veh, n=12 ; veh-DU4, n=6 ; c-veh, n=12 ; c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 / données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Un test Kruskal-Wallis a été effectué. Les différences statistiques entre le groupe c-veh et les autres groupes sont montrées, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

III.4. Effet de la DU contre la diminution CNA-induite du nombre de cellules prolifératives hippocampiques

La figure 51 illustre des photomicrographies de l'immuno-marquage de la protéine Ki-67 (cellules prolifératives) et du marquage au DAPI (noyaux cellulaires) (figure 51B), ainsi que le co-marquage NG2 et Ki-67 au niveau du hile du gyrus denté de l'hippocampe (figure 51E). Les histogrammes montrent la quantification des cellules Ki-67 positives (figure 51A), co-marquées NG2 et Ki-67 (figure 51C) et NG2⁻-Ki67⁺ (figure 51D). Les valeurs moyennes, exprimées en pourcentage du nombre de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules (DAPI positives), montrent que DU4 n'affecte pas le taux de ces cellules Ki-67 positives ($2,1 \pm 0,2$ % similaire au contrôle $1,8 \pm 0,2$ %). Les groupes c-DU2 et c-DU4 présentent respectivement une moyenne de $1,6 \pm 0,2$ % et $1,8 \pm 0,2$ % de cellules Ki-67 positives non différente du contrôle et significativement supérieure au groupe c-veh ($p < 0,05$ et $p < 0,01$). La DU à 1 mg/kg ne permet pas de prévenir la diminution du nombre de cellules Ki-67 positives induite par la CNA, et une valeur moyenne de $1,0 \pm 0,2$ % de cellules prolifératives a été obtenue, équivalente à celle du groupe c-veh ($0,9 \pm 0,2$ %) et significativement plus faible par rapport au contrôle ($p < 0,01$). Il en ressort qu'à partir d'une dose de 2 mg/kg, la DU devient efficace pour prévenir la diminution du nombre de cellules prolifératives au sein de l'hippocampe suite au traitement chimiothérapique. Concernant le co-marquage Ki67-NG2, les rats veh-DU4 présentaient en moyenne $1,1 \pm 0,1$ % de cellules NG2-Ki67 positives. Ces valeurs sont équivalentes à celles observées chez les animaux véhicules ($0,9 \pm 0,2$ %), et significativement plus importantes que pour le groupe c-veh ($0,2 \pm 0,1$ % ; $p < 0,0001$). La DU à 1 mg/kg ne protège pas de manière significative contre cette perte de cellules prolifératives induite par la CNA, cependant cette dernière apparaît moins importante chez les animaux c-DU1 ($0,4 \pm 0,1$ %) par rapport aux animaux c-veh. Par contre les traitements DU2 et DU4 permettent de garder des valeurs moyennes semblables aux

animaux contrôles, avec des moyennes de $0,9 \pm 0,1$ % et $1,0 \pm 0,2$ % respectivement. De façon intéressante, alors que DU à 1mg/kg semble prévenir de façon partielle la diminution drastique du nombre de PO (cellules co-marquées NG2-KI67), elle ne permet pas de contrer la diminution des cellules prolifératives non-NG2 (figure 51D). En effet, la valeur moyenne obtenue pour le groupe c-DU1 est similaire à celle du groupe c-veh ($0,6 \pm 0,1$ %) et statistiquement inférieure au groupe veh-veh et veh-DU4 ($p < 0,05$ et $p < 0,01$). Au contraire les doses DU2 et DU4 avaient un effet protecteur avec des moyennes respectives de $0,9 \pm 0,1$ et $0,9 \pm 0,1$ % qui ne sont cependant pas significativement différentes de celles obtenues dans le groupe c-veh.

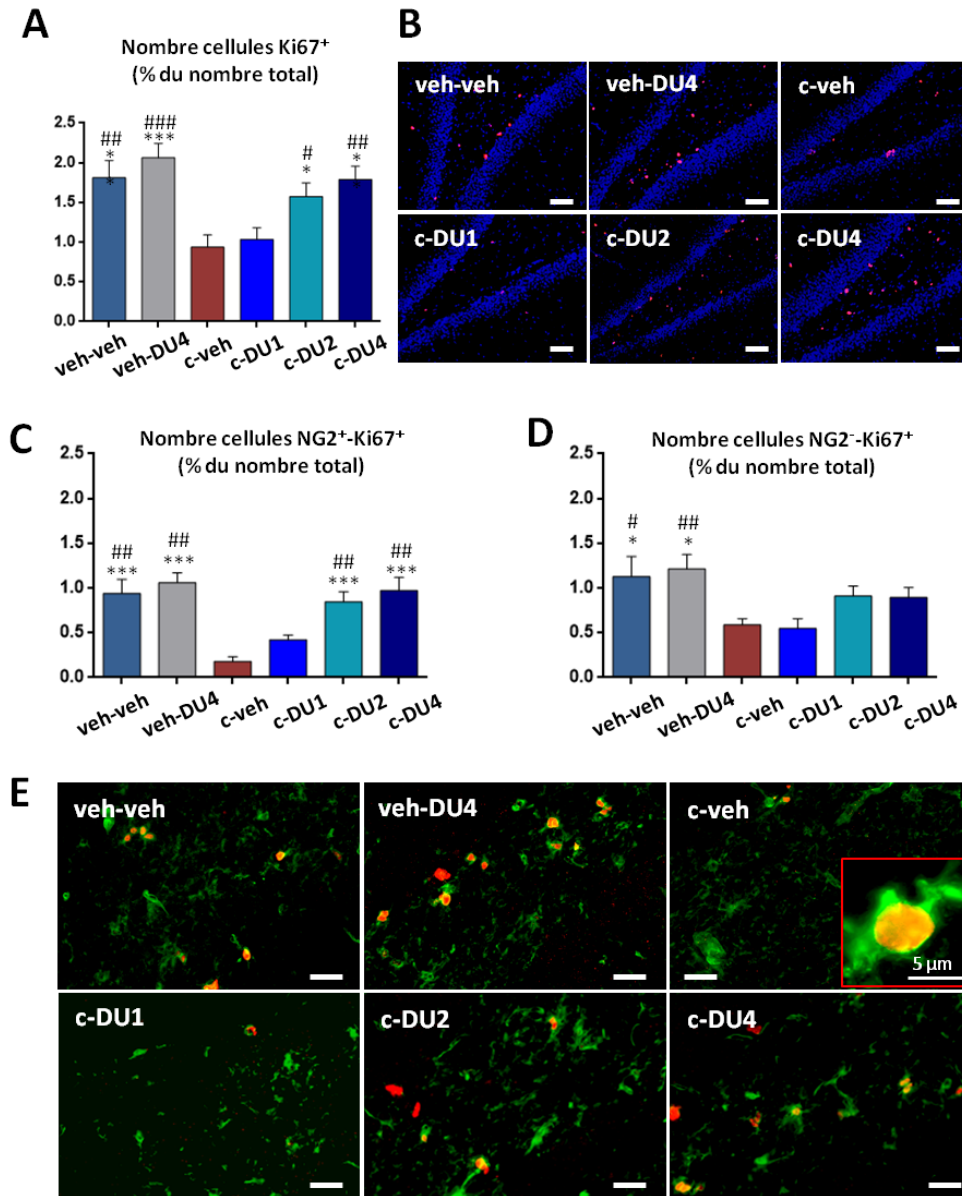


Figure 51 : Effet protecteur de la DU sur la diminution du nombre de cellules prolifératives Ki67-positives, Ki67-NG2 positives et Ki67-non NG2 positives au niveau de l'hippocampe

La quantification du nombre total de cellules Ki67-positives, de cellules doublement marquées Ki67-NG2 positives et de cellules Ki67 positives-NG2 négatives au niveau de l'hippocampe a été réalisée par immuno-marquage fluorescent de coupes sagittales d'encéphales de rats appartenant aux différents groupes expérimentaux. Les photomicrographies représentatives d'immunofluorescences montrent le marquage de la protéine Ki67 (B ; barre d'échelle 50 μ m) ainsi que le co-marquage Ki67-NG2 (E ; barre d'échelle 20 μ m) au niveau du gyrus denté de l'hippocampe. Les histogrammes représentent la moyenne du nombre total de cellules Ki67-positives (A), du nombre de cellules co-marquées Ki67-NG2 positives (C) et du nombre de cellules Ki67 positives non-NG2 (D) au niveau de l'hippocampe des rats veh-veh, veh-DU4, c-veh, c-DU1, c-DU2 et c-DU4, exprimés en pourcentage par rapport au nombre totale de cellules (+ SEM) (groupe veh-veh, n=12 ; veh-DU4, n=6 ; c-veh, n=12 ; c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 / données issues des cohortes B et C – Tableau 13). L'analyse statistique a été faite par un ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Fisher. Les différences statistiques pour la comparaison avec le groupe c-veh (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001) et le groupe c-DU1 (#p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001) sont montrées.

III.5. Effet de la DU sur la diminution CNA-induite des précurseurs d'oligodendrocytes prolifératifs au niveau du corps calleux

La figure 52 présente les photographies et les résultats du comptage du nombre de cellules obtenus concernant le co-marquage fluorescent NG2 et Ki-67 au niveau du corps calleux (figure 52A et B).

Les rats du groupe veh-DU4 présentaient en moyenne $2,9 \pm 0,3$ % de cellules NG2-Ki67 positives. Ces valeurs sont équivalentes à celles observées chez les animaux véhicules, et significativement plus importante en comparaison au groupe c-veh ($p < 0,01$). Toutes les doses de DU testées dans cette étude permettent de prévenir la diminution, induite par la CNA, du nombre de cellules NG2-Ki67 positives au niveau du corps calleux. On retrouve des valeurs de $2,7 \pm 0,4$, $2,3 \pm 0,2$ et $2,6 \pm 0,3$ % en moyenne pour les groupes c-DU1, c-DU2 et c-DU4 respectivement, statistiquement différentes du groupe CNA ($1,5 \pm 0,1$ % ; $p < 0,01$).

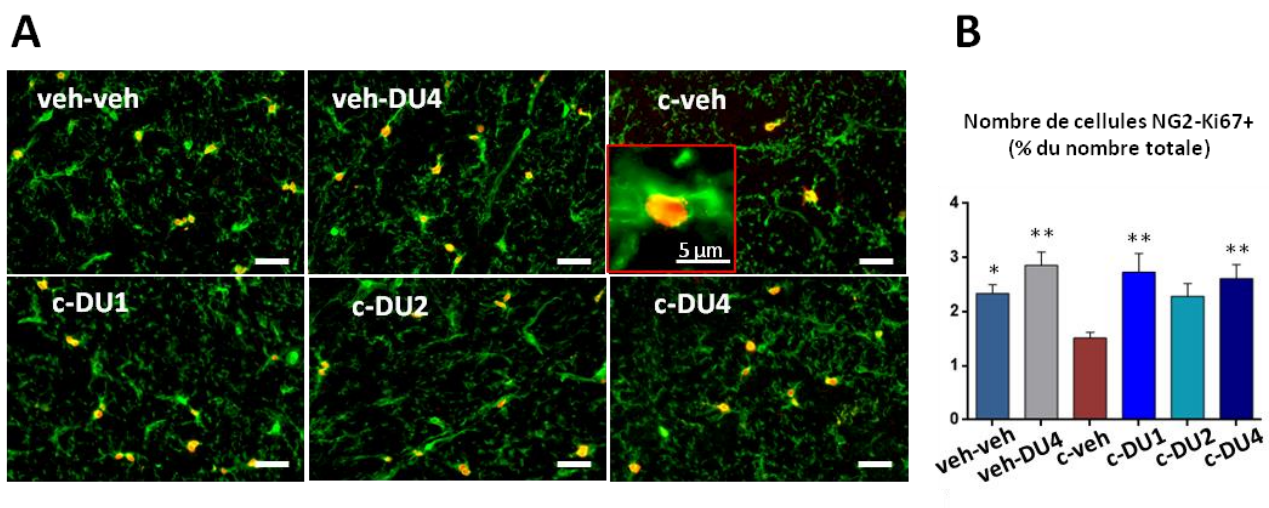


Figure 52 : Effet protecteur de la DU sur la diminution du nombre de cellules co-marquées NG2-Ki67 positives au niveau du corps calleux

Des photomicrographies représentatives au niveau du corps calleux sont montrées en (A) (barre d'échelle 20 µm). Le nombre moyen de cellules NG2-Ki67 positives est exprimé en pourcentage du nombre de cellules total (+ SEM) en (B) (groupe veh-veh, n=12 ; veh-DU4, n=6 ; c-veh, n=12 ; c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 / données issues des cohortes B et C – Tableau 13). Les différences statistiques ont été obtenues par l'application de test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Fisher. Les différences statistiques pour la comparaison avec le groupe c-veh (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) sont montrées.

III.6. Effet de la DU sur l'infiltration leucocytaire au niveau de l'encéphale

Le marquage de la protéine CD45 et le comptage du nombre de cellules positives (leucocytes) (figure 53) montrent que l'augmentation de leucocytes est prévenue par le traitement DU2 et DU4, où le nombre moyen de leucocytes est respectivement de 1190 ± 110 et 1100 ± 120 , similaire à ce qui est obtenu pour le groupe contrôle (1050 ± 100) mais également pour le groupe veh-DU4 (1120 ± 80). Seul le traitement DU1 ne permet pas de contrer cette augmentation du nombre de cellules CD45 positives, où la valeur moyenne (2000 ± 120 cellules) est identique à celle observée pour le groupe c-veh, et significativement supérieure aux valeurs contrôles ($p < 0,0001$).

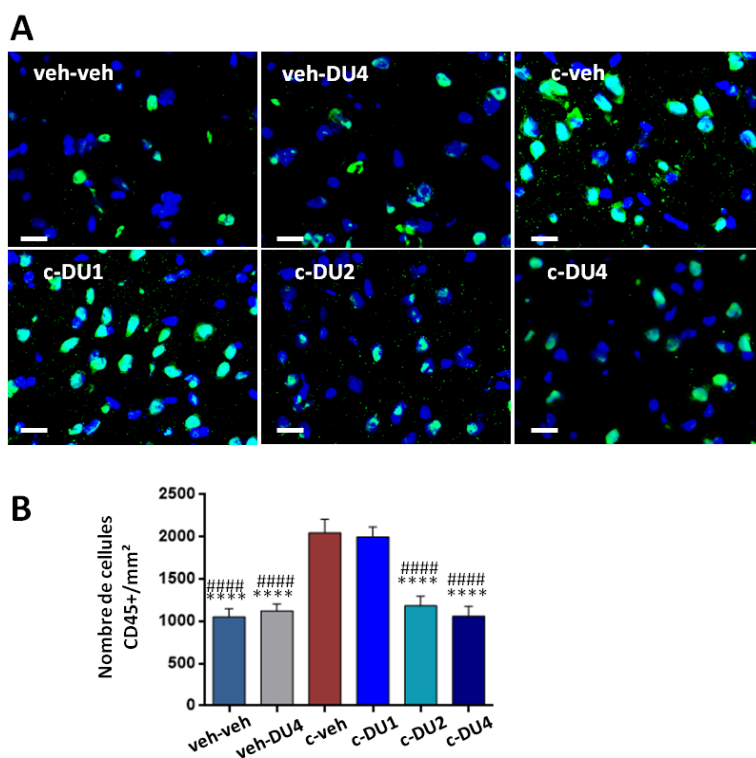


Figure 53 : Effet de la DU sur l'infiltration de cellules CD45 positives au sein de l'encéphale

Des photomicrographies représentatives d'immunofluorescences du marquage de la protéine CD45 dans les tissus cérébraux des rats sont montrées en (A) (barre d'échelle 20 μ m). La quantification du nombre de cellules CD45 positives par mm² est montrée par l'histogramme en (B) (groupe veh-veh, n=12 ; veh-DU4, n=6 ; c-veh, n=12 ; c-DU1, n=6 ; c-DU2, n=12 ; c-DU4, n=12 / données issues des cohortes B et C – Tableau 13). L'analyse statistique à l'aide d'un test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Fisher a été réalisée. Les différences statistiques pour la comparaison avec le groupe c-veh (**** $p < 0,0001$) et le groupe c-DU1 (#### $p < 0,0001$) sont montrées.

Effet de la DU sur les atteintes centrales

EN BREF...

- ✓ Aucun effet de la DU à 4 mg/kg sans CNA en comparaison aux animaux contrôles
- ✓ Effets délétères de la DU à forte dose (8mg/kg), qui devient morbide par toxicité additive à celle de la CNA
- ✓ Effet préventif sur le déficit CNA-induit des performances en mémoire spatiale dépendant de la difficulté de la tâche et de la dose de DU :

Tâche difficile : effet dose de la DU, où 1mg/kg ne suffit pas, 2mg/kg permet une prévention partielle, et complète à 4 mg/kg

Tâche facile : effet préventif complet et efficace dès 2 mg/kg

- ✓ Effets préventifs sur les atteintes CNA-induites des populations cellulaires :

Effet neuroprotecteur sur les modifications des astrocytes CNA-induites, même à faible dose (1mg/kg)

Effet protecteur efficace contre la diminution du nombre de cellules Ki67 positives hippocampiques à partir de 2 mg/kg, alors que DU1 ne suffit pas

Effet neuroprotecteur sur le nombre de cellules PO, même à faible dose (1 mg/kg), au niveau du corps calleux, mais effet dépendant de la dose au niveau de l'hippocampe où DU1 exerce un effet préventif partiel, et efficace à partir de 2 mg/kg

Effet sur l'infiltration de cellules CD45 positives : dose de 1 mg/kg ne suffit pas, alors qu'à 2 et 4 mg/kg on retrouve des valeurs contrôles

DISCUSSION



Nous avons produit et caractérisé pour la première fois un modèle expérimental de neuropathie périphérique évoquée chez des rats femelles adultes par le traitement séquentiel CNA-[EPI-DO] fréquemment utilisé en clinique humaine contre le cancer du sein (Kaufmann, von Minckwitz et al. 2003, Fabi, Papaldo et al. 2004, Hainsworth, Yardley et al. 2006, Lombardi, Scalone et al. 2010, Eckhoff, Nielsen et al. 2011, Trudeau, Chapman et al. 2015). Les symptômes neurologiques périphériques et centraux et les mécanismes qui sous-tendent l'induction des effets de la CNA-[EPI-DO] ont été étudiés grâce à une approche multidisciplinaire associant des analyses comportementales, électrophysiologiques, et histopathologiques.

L'application du protocole de traitement CNA de 3 semaines (EPI d'une semaine à 1mg/kg/2 jours suivie par 2 semaines de DO à 2mg/kg/2 jours), provoque chez le rat des douleurs neuropathiques avec des symptômes similaires à ceux observés chez l'humain (Pereira et al. 2016, Starobova and Vetter 2017). En effet, après traitement avec la CNA-[EPI-DO], les rats ont développé des anomalies sensorielles telles que l'allodynie et l'hyperalgie mécaniques ainsi que l'allodynie thermique au froid. En clinique, l'évaluation neurophysiologique objective des NPCI implique des études de conduction nerveuse qui fournissent des informations précieuses sur l'étendue des dysfonctionnements axonaux chez les patients souffrant de neuropathie à la suite de la chimiothérapie (Park, Goldstein et al. 2013). La réduction de l'amplitude maximale du PAN est une constatation fréquente chez les patients atteints de neuropathie périphérique induite par la CNA, confirmant le développement d'un aspect axonal de la neuropathie (Park, Goldstein et al. 2013). Dans le présent travail, nous avons observé des altérations de la conduction nerveuse du nerf sciatique chez des rats traités à la CNA-[EPI-DO], entraînant une forte diminution (supérieure à 50%) de l'amplitude maximale du PAN, et une réduction plus modeste (20%) de la vitesse de conduction. Ces altérations neurophysiologiques associées à la neuropathie sont corrélées à

une diminution dans les nerfs sciatiques de l'expression du neurofilament 200 Kd qui est un marqueur axonal spécifique. L'ensemble de nos résultats montre que le traitement CNA-[EPI-DO] induit chez le rat une axonopathie similaire à celle observée chez les patients (Chaudhry, Rowinsky et al. 1994, Dougherty, Cata et al. 2004).

Le modèle murin fiable que nous avons généré a été extrêmement utile pour évaluer et comparer l'efficacité de la DU, de l'AP et d'un mélange concomitant de DU et d'AP (DUAP) sur divers paramètres comportementaux, électrophysiologiques et immunohistochimiques modifiés par la CNA-[EPI-DO]. Les effets de la DU comme traitement thérapeutique des NPCI ont été évalués dans une étude sponsorisée par l'Institut National du Cancer (Smith, Pang et al. 2013, Seretny, Currie et al. 2014). Bien que cette étude fournisse des résultats positifs, l'effet bénéfique de la DU reste modeste et semble être plus efficace contre les neuropathies induites par l'oxaliplatine par rapport aux troubles neurologiques évoqués par les taxanes (Smith, Pang et al. 2013, Majithia et al. 2016). Le présent travail montre également un effet protecteur partiel et modeste de la DU contre les altérations neurologiques chimio-induites, car la DU diminue uniquement et légèrement la sévérité des symptômes douloureux évoqués par la CNA-[EPI-DO] sans être capable de les éradiquer complètement.

L'AP a été plus efficace que la DU, bien que l'AP n'ait également exercé que des effets protecteurs partiels dans notre modèle de rat développant une douleur neuropathique secondaire à la CNA-[EPI-DO]. Cette observation révèle que l'AP ne présente pas la même efficacité contre tous les différents types de NPCI. En effet, alors que de précédentes études issues de notre laboratoire ont démontré que l'AP à 4 mg/kg/2 jours est capable de supprimer complètement les symptômes sensoriels et moteurs induits par l'oxaliplatine et la vincristine (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Meyer, Patte-Mensah et al. 2011, Taleb, Bouzobra et al. 2017), la présente analyse ne montre que des effets bénéfiques partiels de l'AP contre la NPCI douloureuse évoquée par la CNA-[EPI-DO].

Les mécanismes neurotoxiques impliqués dans la pathogenèse de la NPCI sont dépendants de l'agent anticancéreux et de sa dose cumulée (Grisold et al. 2012, Argyriou et al. 2014, Johnson et al. 2015, Starobova and Vetter 2017). Par ailleurs, il est également important de rappeler que, dans le présent travail, nous avons utilisé des rats femelles pour produire un modèle de NPCI suite à un traitement CNA-[EPI-DO] du cancer du sein, alors que les évaluations antérieures des actions de l'AP contre les NPCI induites par l'oxaliplatine et la vincristine ont portées sur des rats mâles. Par conséquent, il semble que l'efficacité de l'AP contre les NPCI peut dépendre à la fois des différences entre les sexes, mais également de la spécificité des mécanismes neurotoxiques de l'anticancéreux mis en cause. À l'appui de cette idée, d'importantes différences liées au genre ont été mises en évidence dans le développement ainsi que dans la réversibilité de la douleur neuropathique chez les souris, où le processus de régénération faisant suite à des dommages nerveux est plus rapide chez les mâles que chez les femelles (Vacca et al. 2014). Une autre étude de DeLeo et Rutkowski a montré que l'allodynie mécanique est significativement plus importante chez des rats femelles Sprague-Dawley comparés aux mâles à la suite d'une transection du nerf spinal (DeLeo and Rutkowski 2000).

Nos travaux révèlent également une infiltration de macrophages (cellules CD11b/c positives) dans les nerfs sciatiques et une dédifférenciation/reprogrammation des cellules de Schwann mise en évidence par une augmentation de l'expression de GFAP. Ces résultats suggèrent que les toxicités additives de l'EPI et du DO, utilisés en séquentiel, peuvent contribuer à l'installation d'un état pro-inflammatoire. En effet, plusieurs preuves s'accumulent pour soutenir un rôle important de la neuro-inflammation dans le développement des NPCI et dans les altérations du SNC étant donné que les anticancéreux qui pénètrent les axones périphériques traversent également la BHE dans certaines circonstances

(McWhinney et al. 2009, Park, Goldstein et al. 2013, Warwick and Hanani 2013, Gornstein and Schwarz 2014, Makker, Duffy et al. 2017). La chimiothérapie, et/ou sa neurotoxicité, active aussi les cellules de Schwann qui répondent par des changements phénotypiques comprenant une surexpression de GFAP (Jessen and Mirsky 2005, Berg, Zelano et al. 2013, Namgung 2014). Ce processus permet le recrutement de macrophages dans les nerfs périphériques (Jessen and Mirsky 2016, Lees, Makker et al. 2017). En plus de stimuler la sécrétion de médiateurs par le recrutement de macrophages, les cellules de Schwann libèrent elles-mêmes des facteurs pro-inflammatoires qui augmentent l'excitabilité neuronale et entraînent une hypersensibilité à la douleur (Milligan and Watkins 2009, Lees, Makker et al. 2017). La surproduction de cytokines et/ou la neuro-inflammation prolongée peut causer des dommages permanents des tissus nerveux, et induire une douleur neuropathique (Dubovy, Klusakova et al. 2014, Namgung 2014). Parallèlement, il a été suggéré que l'infiltration des cellules immunitaires et l'activité de cytokines pro-inflammatoire dans les nerfs et les ganglions de la racine dorsale sont impliquées dans la douleur neuropathique et les NPCI (Moalem and Tracey 2006, Liu et al. 2012, Liu, Zhang et al. 2014, Zhang, Li et al. 2016, Makker, Duffy et al. 2017).

De façon intéressante, nous avons constaté que la combinaison concomitante DUAP empêche efficacement l'infiltration dans les nerfs sciatiques des macrophages (cellules positives CD11b/c) ainsi que la dédifférenciation/reprogrammation des cellules de Schwann. Ceci suggère que le spectre des mécanismes d'actions couverts par les effets concomitants de la DU et de l'AP est suffisant pour prévenir certains processus neuro-inflammatoires induits par la chimiothérapie. En effet, les données dans la littérature suggèrent un effet neuroprotecteur contre les stimuli inflammatoires par cytoprotection exercé par l'AP et potentiellement par la DU. Les macrophages sont connus pour exprimer des récepteurs GABA-A fonctionnels, dont l'activation par différents agonistes modifie leur comportement (Bhat et al. 2010).

Notamment, il a été démontré que l'activation de ces récepteurs conduit à une réduction de la production de cytokines inflammatoires par les macrophages (Reyes-Garcia et al. 2007). Il a été démontré que des macrophages murins traités avec de l'AP produisent des taux plus faibles de TNF- α après stimulation par le LPS (Ghezzi et al. 2000). Dans une autre étude, le traitement des macrophages dérivés de monocytes humains avec de l'AP a réduit la production d'IL-1 β et de TNF- α après l'induction d'une inflammation suite à l'exposition au PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate). Le traitement par l'AP réduit également l'expression d'enzyme macrophagique impliquée dans divers processus inflammatoires (Noorbakhsh et al. 2011). De plus, l'AP peut prévenir la neuroinflammation en réduisant la prolifération des cellules immunitaires (Noorbakhsh, Baker et al. 2014). Les monocytes expriment également des récepteurs à la sérotonine. Il a été démontré que l'activation des récepteurs à la sérotonine sur les monocytes permet de diminuer le relargage de TNF- α induit par le LPS (Durk, Panther et al. 2005). Ceci suggère que la sérotonine est impliquée dans les processus anti-inflammatoires, et que la DU, qui augmente les taux de sérotonine, peut exercer des effets anti-inflammatoires. L'administration de DU est liée à une augmentation du taux sérique d'IL-10 qui est connu comme étant une cytokine anti-inflammatoire essentielle pour inhiber la production de TNF- α et d'IL-6 (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991, Ohgi, Futamura et al. 2013).

Divers travaux suggèrent que les actions neuroprotectrices de la DU et de l'AP seraient médiées par des mécanismes anti-oxydants impliquant l'augmentation de l'expression d'enzymes antioxydantes, antagonisant la surproduction de ROS (Zampieri et al. 2009, Grewal et al. 2013, Qian et al. 2015, Lee, Park et al. 2016, Cho et al. 2018, Engel, de Oliveira et al. 2018). Par exemple, il a été démontré qu'un prétraitement à l'AP avait un effet protecteur contre la mort cellulaire en favorisant l'expression et l'activité de l'enzyme

antioxydante superoxyde dismutase SOD (Grewal, Jaggi et al. 2013, Cho, Kim et al. 2018). Les effets neuroprotecteurs de l'AP et de ses analogues peuvent aussi impliquer différents systèmes incluant les voies des récepteurs GABA-A ou d'autres cibles non encore identifiées (Lejri et al. 2017, Taleb, Patte-Mensah et al. 2018). Des neuroblastomes humains SH-SY5Y ont récemment été utilisés pour évaluer l'effet neuroprotecteur de la DU contre le stress oxydatif induit par la roténone (Engel, de Oliveira et al. 2018). Les auteurs proposent un mécanisme de l'effet neuroprotecteur de la DU contre le stress oxydatif impliquant la voie PI3k/Akt. Cette voie de signalisation est centrale dans la réponse antioxydante en entraînant la phosphorylation du facteur de transcription Nrf2, qui contrôle l'expression de l'enzyme antioxydante oxygénase 1 (HO-1). L'administration chronique de la DU augmente les niveaux d'expression de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF, qui activerait la voie de signalisation PI3k/Akt entraînant alors la production d'enzyme antioxydante. Ces enzymes permettent de protéger les cellules contre l'augmentation des niveaux de ROS induite par la roténone, ce qui conduit au maintien de la survie cellulaire, et à l'inhibition de l'apoptose en réponse au stress cellulaire.

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que la combinaison DUAP activerait plusieurs voies neuroprotectrices et constituerait ainsi une stratégie multi-cible capable de contrecarrer simultanément les divers et complexes mécanismes neurotoxiques qui déterminent les NPCI.

A l'appui de cette hypothèse, notre travail de thèse démontre que la thérapie combinée DUAP prévient efficacement l'altération de plusieurs paramètres modifiés par la CNA-[EPI-DO], y compris l'allodynie thermique au froid, l'allodynie/l'hyperalgie mécanique, l'amplitude du PAN, la vitesse de conduction nerveuse, la dédifférenciation/reprogrammation des cellules de Schwann, l'infiltration macrophagique et l'expression du marqueur neuronal NF200 dans les nerfs sciatiques.

De façon intéressante, des résultats antérieurs de notre Laboratoire ont révélé que la posologie d'AP utilisée dans ce travail de thèse n'altère pas l'efficacité du traitement antitumoral dans un modèle de cancer de la peau chez le rat, généré avec des cellules mammaires carcinomateuses Walker 256 (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010). Cependant, l'utilisation d'AP en clinique pour améliorer l'efficacité de la DU contre la NPCI par la CNA-[EPI-DO] chez les patientes atteintes d'un cancer du sein doit être évaluée avec une attention particulière. En effet, d'autres études révèlent que l'AP peut favoriser la prolifération des cellules souches neurales, même si cet effet est complètement déplacé vers une action antiproliférative à certaines doses (Wang et al. 2005). De façon intéressante, de récents travaux ont permis la caractérisation de nouveaux analogues de l'AP, parmi lesquels certains exercent des effets neuroprotecteurs puissants sans activité proliférative (Karout, Miesch et al. 2016, Lejri, Grimm et al. 2017, Taleb, Patte-Mensah et al. 2018). Par conséquent, si nécessaire, ces analogues peuvent offrir des possibilités intéressantes et supplémentaires pour sécuriser la translation vers la clinique de la stratégie concomitante basée sur le mélange DUAP, révélé par ce travail préclinique comme une thérapie efficace et prometteuse contre les NPCI induites par la CNA-[EPI-DO].

Comme cela s'observe chez les patientes, la toxicité de la CNA-[EPI-DO] affecte également le SNC dans notre modèle expérimental de rats femelles. En effet, ce travail de thèse montre que la CNA-[EPI-DO] provoque des troubles cognitifs chez le rat avec des déficits équivalents à ceux observés chez les patientes ou dans d'autres modèles expérimentaux utilisant d'autres agents chimiothérapiques (de Ruiter, Reneman et al. 2011, Jim et al. 2012, Seigers, Schagen et al. 2013). Chez les patientes, les déficits chimio-induits concernent, entre autres, des dysfonctionnements de la mémoire épisodique. Ce système de mémoire fait référence aux souvenirs des événements qu'un individu a personnellement vécus, inscrit dans

un contexte spatio-temporel précis (« où », « quoi » et « quand »), et dont la restitution nécessite un effort conscient. Compte tenu du spectre des déficits neurocognitifs induits par la chimiothérapie chez les patientes, la toxicité de l'hippocampe – structure jouant un rôle clef dans la formation de la mémoire, de l'apprentissage et dans les processus spatiaux – semble être un important facteur causal ou déterminant du syndrome de *chemobrain* (Dietrich, Prust et al. 2015, Orchard, Gaudier-Diaz et al. 2017). En conséquence, notre choix s'est donc porté sur l'évaluation de la mémoire spatiale dans notre modèle murin. En effet, les performances de la mémoire spatiale chez le rongeur sont dépendantes de l'intégrité de l'hippocampe et leur évaluation permet de modéliser la mémoire épisodique (Tuscher, Szinte et al. 2016). On parle alors de mémoire de « type épisodique » (*episodic-like*). Ainsi, nous avons utilisé un test de reconnaissance spatiale pour comparer les performances des rates témoins et traitées par la CNA-[EPI-DO]. Nos résultats montrent que cette dernière provoque chez l'animal des troubles de l'apprentissage et des capacités mnésiques de type épisodique.

Le test utilisé dans nos travaux offre plusieurs possibilités. En utilisant des déplacements d'objets proches de la limite de détection pour des rats sains (déplacement de 20cm dans cette étude), ce test permet en particulier de détecter chez les rongeurs un déclin cognitif précoce et/ou subtil. D'autre part, cette tâche basée sur la détection de changements subtils dans la localisation spatiale d'objets, est également utilisée pour évaluer un processus cérébral particulier, dénommé la séparation de pattern (*pattern separation* ou PS) (van Hagen, van Goethem et al. 2015, Ces, Burg et al. 2018). On pourrait alors également suggérer que la CNA-[EPI-DO] provoque une atteinte dans les réseaux de la séparation de pattern.

La séparation de pattern permet de différencier des expériences similaires. En évitant les interférences, ce processus de séparation de pattern est une caractéristique essentielle de la mémoire épisodique (Yassa and Stark 2011, Ces, Burg et al. 2018). En effet, en plus de permettre la discrimination entre des souvenirs similaires, ce processus cérébral est considéré

comme fondamental et critique pour le codage et la récupération de la mémoire épisodique (Yassa and Stark 2011, Pidgeon and Morcom 2016). Ainsi, un déficit dans les réseaux de la séparation de pattern est suggéré comme contribuant au déficit de la mémoire épisodique (Stark et al. 2013, Das et al. 2014, Dery et al. 2015). Bien que plusieurs études suggèrent un rôle facilitateur essentiel de l'hippocampe et de la neurogenèse au niveau du gyrus denté hippocampique pour le processus de séparation de pattern, les mécanismes ne sont pas encore élucidés.

Le SNC étant isolé et protégé par la BHE, certains auteurs supposent que la chimiothérapie, de façon directe ou non, altère l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de cette barrière protectrice. En la rendant plus perméable, la chimiothérapie rendrait alors vulnérable certaines populations cellulaires au sein du SNC, notamment à division rapide.

Pour aborder l'étude des mécanismes impliqués dans la toxicité centrale évoquée par la CNA-[EPI-DO], une première question a été de savoir si ce traitement altère la perméabilité de la BHE. Compte tenu de l'action toxique classiquement exercée par les taxanes sur le cytosquelette, nous avons étudié la possibilité d'un passage de l'agent antinéoplasique par une voie paracellulaire de la BHE. L'utilisation d'un traceur de haut poids moléculaire, le bleu Evans, a révélé une augmentation significative de 25% du passage paracellulaire de la BHE après 28 jours de traitement CNA-[EPI-DO].

Le bleu Evans (961 Da) se fixe fortement à l'albumine sérique (69 000 Da), et permet d'évaluer le passage de la BHE par un traceur de haut poids moléculaire (environ 70 kDa) (Saria and Lundberg 1983, Kaya and Ahishali 2011, Yen et al. 2013). Les propriétés des cellules endothéliales formant la BHE conduisent à ce que de nombreux agents thérapeutiques n'atteignent pas le tissu cérébral (O'Keeffe and Campbell 2016). Ainsi, il a été démontré qu'une dose unique de docétaxel et d'épirubicine sont incapables de s'accumuler dans le SNC

(Bigotte and Olsson 1989, ten Tije et al. 2004). La fragilisation de la BHE évoquée par la CNA-[EPI-DO] pourrait faciliter le passage des molécules anticancéreuses dans le SNC où elles induiraient une action toxique directe sur les populations cellulaires en division. Ceci pourrait alors rendre compte des altérations centrales associées à la CNA.

La diffusion des substances à travers l'espace paracellulaire de la BHE est basée sur l'exclusion de taille. En effet, les complexes de jonctions serrées (TJ) créent un maillage rendant le passage paracellulaire contrôlé et étanche. Les TJ sont constituées de protéines membranaires telles que les claudines, les occludines et des molécules jonctionnelles adhérentes (*junction adherent molecules* ou JAM), mais aussi de protéines accessoires cytosoliques (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cinguline), qui se lient au cytosquelette des cellules endothéliales constituant la BHE.

Une augmentation du passage paracellulaire à travers la BHE, conséquence de la chimiothérapie, pourrait être sous-tendue par l'altération ou la modification de l'expression d'une ou de plusieurs de ces protéines jonctionnelles. Parmi les composants de la BHE, la protéine ZO-1 a été suggérée pour particulièrement fournir un lien fonctionnel entre les cellules endothéliales, intervenant dans les réarrangements du cytosquelette et de la morphologie cellulaire (Van Itallie et al. 2009, Fanning et al. 2012, O'Keeffe and Campbell 2016). Il a été démontré que l'inactivation ciblée de ZO-1 dans les cellules endothéliales dermiques humaines entraîne une diminution de la tension cellulaire, entraînant une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Cette augmentation du passage paracellulaire est comparable aux résultats obtenus avec le *knock-down* siRNA dirigé contre la protéine claudine-5, suggérant que le rôle de ZO-1 dans l'intégrité de la BHE pourrait être dû en grande partie à la protéine claudine-5. Indépendamment de la protéine claudine-5, la suppression de ZO-1 a également entraîné des changements dans la morphologie des cellules endothéliales (Van Itallie, Fanning et al. 2009, Fanning, Van Itallie et al. 2012, O'Keeffe and

Campbell 2016). D'autres études démontrent que la co-suppression des protéines claudine-5 et occludine module les voies de passage de la BHE, autorisant le passage paracellulaire par diffusion de molécules de plus grande taille (Campbell et al. 2008, Keaney et al. 2015).

L'augmentation de la perméabilité paracellulaire observée dans notre étude suite à la CNA-[EPI-DO] pourrait également s'expliquer par une toxicité des cellules endothéliales constituant la BHE. Effectivement, des études révèlent un lien entre chimiothérapie et toxicité vasculaire (Wefel, Kayl et al. 2004). Le docétaxel notamment aggrave les dysfonctionnements endothéliaux à travers la production de ROS faisant suite à un stress oxydant chimio-induit. Par l'activation de la voie des caspases, ce stress oxydant chimio-induit peut conduire ainsi à des dommages de l'ADN, et *in fine* à l'apoptose des cellules endothéliales (Hung, Chan et al. 2015). Il a également été suggéré que l'épirubicine entraîne un stress oxydant, endommageant les cellules endothéliales par l'activation de la voie p38 (Yamada, Egashira et al. 2012).

De façon intéressante, nous avons également montré dans ce travail de thèse que la perméabilité accrue de la BHE s'accompagne d'une diminution de 25% de l'expression de GFAP, marqueur des astrocytes. Ces altérations pourraient participer à la perte de l'intégrité fonctionnelle de la BHE suite à la CNA-[EPI-DO].

Outre le rôle de neuroprotection et de support trophique pour les cellules neuronales, les astrocytes sont des éléments constitutifs importants de la BHE (Ballabh, Braun et al. 2004). En plus d'apporter une intégrité fonctionnelle par la sécrétion de plusieurs facteurs, le contact direct entre les cellules endothéliales et les astrocytes est indispensable pour générer une BHE optimale (Rubin 1991), où les astrocytes influencent la morphologie et l'organisation des cellules endothéliales (Ballabh, Braun et al. 2004). Les astrocytes jouent donc un rôle central dans le maintien de l'intégrité de la BHE par des mécanismes dépendants du contact avec les cellules endothéliales et de la libération de facteurs trophiques (Janzer and Raff 1987, Hayashi

et al. 1997, Alvarez, Meyer et al. 2013, Wang, Jin et al. 2014). Une étude a révélé que la protéine *sonic hedgehog* (SHH) libérée par les astrocytes favorise la formation et l'intégrité de la BHE par augmentation de la synthèse des protéines des TJ dans les cellules endothéliales (Alvarez et al. 2011). Il est connu que SHH se lie et inactive son récepteur *Patched-1* (Ptch-1) présent sur les cellules endothéliales, ce qui permet à la protéine *Smoothened* (Smo) d'activer le facteur de transcription *Gli-1* qui régule à la hausse les protéines des TJ, et améliore l'intégrité de la BHE (Osterlund and Kogerman 2006, Alvarez, Dodelet-Devillers et al. 2011, Wang, Jin et al. 2014).

D'autres études proposent également que les agents cytotoxiques entraînent une réponse inflammatoire périphérique, causant alors une toxicité au niveau du SNC indirectement via les voies de cytokines pro-inflammatoires (Cheung, Lim et al. 2013). Plusieurs cytokines peuvent traverser la BHE et atteindre le SNC (Banks, Kastin et al. 1989, Banks, Kastin et al. 1993, Gutierrez, Banks et al. 1993, Banks, Kastin et al. 1994, Osburg, Peiser et al. 2002, Pan, Kastin et al. 2003, Banks 2004, Pan, Ding et al. 2006, Pan, Stone et al. 2011). Bien que les cytokines ainsi transportées soient importantes pour le bon fonctionnement du SNC, elles jouent également un rôle crucial dans le développement des changements cérébraux et des déficits cognitifs suite à la chimiothérapie (Ren, St Clair et al. 2017). Notamment, ces cytokines au niveau du SNC activent les cellules microgliales et les astrocytes qui secrètent en retour des médiateurs pro-inflammatoires conduisant notamment à la migration de cellules immunitaires (Hanisch and Kettenmann 2007). Les cytokines induisent également un stress oxydant conduisant à des dommages cellulaires associés aux déficits cognitifs (Osburg, Peiser et al. 2002, Tangpong, Cole et al. 2006, Lacourt and Heijnen 2017). Cette neuro-inflammation au niveau du SNC est d'ailleurs suggérée comme un des principaux mécanismes dans la genèse des symptômes neurotoxiques (Vichaya, Chiu et al. 2015, Lacourt and Heijnen 2017).

A l'heure actuelle peu d'études ont cherché à faire le lien entre cytokines et chimiothérapie chez les patientes, mais des évidences émergentes indiquent que la chimiothérapie serait associée à l'augmentation de cytokines, qui elle-même est toujours associée à une diminution de l'habileté à apprendre, ainsi qu'à des altérations de la mémoire de travail et des capacités cognitives (Gahtan and Overmier 2001, Sparkman, Buchanan et al. 2006, Ren, St Clair et al. 2017). Quelques études relatent que la chimiothérapie entraîne une augmentation de cytokines dans le sérum des patientes, en lien avec des troubles cognitifs (Penson, Kronish et al. 2000, Osburg, Peiser et al. 2002, Tsavaris, Kosmas et al. 2002, Pusztai, Mendoza et al. 2004, Tangpong, Cole et al. 2006). A notre connaissance, aucune étude préclinique n'a évalué les concentrations sériques des cytokines suite à l'administration de chimiothérapie.

Après l'administration de la CNA-[EPI-DO], nous avons effectué un dosage de cytokines circulantes. Ce dosage a été réalisé une semaine après la fin de la chimiothérapie, par l'utilisation du test BDTM *Cytometric Bead Array*, et nous a permis d'évaluer les concentrations sériques des cytokines pro-inflammatoires IFN et TNF- α , et anti-inflammatoires IL-4 et IL-10. Dans notre modèle, une semaine après l'arrêt du traitement chimiothérapique, la CNA n'entraîne pas de changement au niveau des concentrations sériques des deux cytokines pro-inflammatoires étudiées. Concernant les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10, malheureusement, l'analyse de leur concentration sérique n'a pas été exploitable dans cette étude, en raison de valeurs bien en dessous du seuil de détection par le kit BDTM *Cytometric Bead Array*. Cette absence de modifications dans les concentrations sériques du TNF- α et de l'IFN dans notre étude n'est pas forcément synonyme de l'absence d'une inflammation périphérique chimio-induite. Nous pouvons envisager que la CNA-[EPI-DO] entraîne des modifications dans la balance des cytokines circulantes impliquant d'autres cytokines pro-inflammatoires que celles étudiées dans ce travail. D'autre part, n'ayant pas évalué la cinétique des concentrations sériques des cytokines, nous pouvons

également suggérer que l'analyse des niveaux de cytokines une semaine après la fin de la chimiothérapie n'ait pas permis de voir de changements dans les niveaux de cytokines circulantes faisant suite à la CNA-[EPI-DO].

L'évaluation d'une possible infiltration de l'encéphale par des cellules immunitaires leucocytaires a été réalisée par immuno-marquage fluorescent de la protéine CD45, marqueur commun des leucocytes. Le comptage du nombre de cellules CD45-positives révèle que la CNA entraîne chez les rats une augmentation conséquente de cellules CD45-positives en doublant leur nombre. Ce travail de thèse ne permet pas de savoir si cette infiltration de cellules immunitaires au sein du SNC fait suite à une inflammation d'origine périphérique due à la chimiothérapie, ou est une conséquence d'une toxicité par les agents antinéoplasiques ayant pénétré le SNC à la suite d'une augmentation de la perméabilité de la BHE. La cytotoxicité directe des agents chimiothérapiques suite à l'altération partielle de la BHE, et les mécanismes de neuro-inflammation se produisent très probablement de concert. D'autant plus qu'il est bien établi qu'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires ont des effets délétères sur les jonctions serrées, et par conséquent sur l'intégrité de la BHE. Par exemple, l'IL-1 ou encore l'IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires qui agissent à la fois sur les cellules endothéliales et sur les astrocytes, et augmentent la perméabilité de la BHE (Wang, Jin et al. 2014), permettant ainsi la pénétration de la chimiothérapie au niveau du SNC et entraînant une amplification de la neurotoxicité et des symptômes cognitifs.

L'hippocampe est une structure clé dans le fonctionnement de la mémoire spatiale, notamment en raison de la neurogenèse locale qui permet un renouvellement cellulaire par la prolifération des précurseurs neuronaux (Lemaire, Tronel et al. 2012). Nous avons donc mesuré la prolifération cellulaire dans l'hippocampe et constaté que la CNA-[EPI-DO] induit une diminution de 50% du nombre de cellules exprimant le marqueur Ki-67 des cellules

prolifératives. Ces résultats suggèrent que la CNA provoque une toxicité des cellules souches impliquées dans la neurogenèse hippocampique adulte qui pourrait sous-tendre les troubles cognitifs observés.

Par ailleurs, compte tenu des anomalies de la substance blanche décrites par des études de neuro-imagerie chez les patientes souffrant de troubles centraux chimio-induits, nous nous sommes également intéressés aux précurseurs des oligodendrocytes (PO).

Les oligodendrocytes nouvellement générés à partir de leurs précurseurs influencent la myélinisation dans le cerveau adulte. En effet, ils participent à la myélinisation des axones, au remodelage de la myéline existante, et aux mécanismes de maintien et de l'entretien de la myéline, voire de la restauration après démyélinisation (Robins, Trudel et al. 2013, Monje 2018). Les lésions de la substance blanche et la perte d'oligodendrocytes sont des caractéristiques représentatives de nombreuses maladies neurodégénératives. Dans les conditions pathologiques des maladies du SNC, les PO, en réponse aux lésions, seraient activés en tant que réponse compensatoire, où les cellules PO initient leur prolifération et leur différenciation à des fins de remyélinisation (Ohtomo et al. 2018). L'oligodendrogenèse joue également un rôle important dans la cognition (Monje 2018, Ohtomo, Iwata et al. 2018). En effet, la plasticité de la substance blanche a été observée par l'utilisation de la neuroimagerie chez les humains suite à l'apprentissage d'une seconde langue, suggérant que de tels changements structurels sont associés au bon déroulement de l'apprentissage (Schlegel et al. 2012). De plus, plusieurs études révèlent que l'oligodendrogenèse est un processus important dans le SNC sain des rongeurs (Rivers et al. 2008, Clarke et al. 2012, Duque et al. 2012, Zuccaro and Arlotta 2013). En effet, le bon déroulement des différents processus cognitifs repose sur la communication efficace entre les réseaux neuronaux interconnectés au niveau de l'encéphale. Il est connu que la gaine de myéline est critique pour la synchronisation de la transmission de l'information entre les zones cérébrales, favorisant ainsi la capacité de ces

réseaux à s'adapter au fil du temps (Pajevic et al. 2014, Fields 2015, Porter et al. 2018). Une perturbation dans l'oligodendrogénèse affecte ainsi la capacité des réseaux cérébraux à fonctionner correctement (Alizadeh et al. 2015) altérant ainsi les capacités cognitives (Porter, Leckie et al. 2018).

Dans ce travail de thèse, des analyses de double-marquage immunohistochimique du *Neural/glial antigen 2* ou NG2 (marqueur des PO) et de Ki-67 (marqueur de prolifération cellulaire) montrent que la CNA-[EPI-DO] provoque une diminution de 35% ou 80% du nombre de cellules NG2-Ki67 positives respectivement dans le corps calleux (CC) ou l'hippocampe. Ces données sont en faveur d'un effet toxique de la CNA-[EPI-DO] sur les PO et la myélinisation dans le SNC, qui pourrait sous-tendre les déficits cognitifs observés dans notre modèle.

L'utilisation de ce modèle animal nous a ensuite permis d'évaluer le potentiel et/ou l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les symptômes cognitifs évoqués par la CNA-[EPI-DO]. Différents travaux montrent que la DU exerce des effets positifs sur la cognition, notamment chez des patients atteints de trouble dépressif majeur (Herrera-Guzman, Herrera-Abarca et al. 2010, Greer, Sunderajan et al. 2014). Cependant, la DU n'a pas été évaluée en préclinique ou en clinique dans le contexte du *chemobrain*. Nous avons alors testé le potentiel neuroprotecteur de la DU contre les altérations centrales induites par la CNA-[EPI-DO]. Nous avons réalisé une relation dose-réponse en utilisant différentes doses de DU, à savoir 1, 2, 4 et 8 mg/kg/injection.

En premier lieu, nous avons observé que la DU à 8mg/kg/injection, en co-administration avec la chimiothérapie CNA-[EPI-DO], s'avère être délétère et mortelle pour les rats.

En clinique, il est connu que la DU entraîne des effets secondaires fréquents, en particulier à forte dose (120mg/jour) (Lunn, Hughes et al. 2014), qui sont responsables pour 1 patient sur 4 de l'arrêt du traitement DU (Goldstein, Lu et al. 2005, Gahimer, Wernicke et al. 2007, Skljarevski, Desai et al. 2009, Skljarevski, Zhang et al. 2010, Chappell, Desai et al. 2011, Yang, Lin et al. 2012, Kanbayashi, Inagaki et al. 2017).

Les études précliniques évaluant les effets protecteurs de la DU dans différents modèles de lésions cérébrales (ischémie cérébrale, excitotoxicité par injection d'acide kaïnique) utilisent des concentrations bien plus élevées que celles utilisées dans nos travaux (Choi, Park et al. 2015, Lee, Park et al. 2016, Park and Lee 2018). Dans ces études, des concentrations de 10, 20 et 40mg/kg ont été administrées, allant jusqu'à des doses cumulées de 120mg/kg (Choi, Park et al. 2015) et de 600mg/kg (Lee, Park et al. 2016), et aucun auteur ne rapporte d'événements indésirables notoires. Aucun effet secondaire mortel pour les animaux n'a été notifié dans d'autres études combinant la DU à des agents chimiothérapiques (bortézomib, oxaliplatine, paclitaxel), utilisant des doses de DU entre 2,5 et 100mg/kg, où une dose de 30mg/kg est administrée dans la majorité des cas (Ito, Tajima et al. 2012, Balayssac, Ling et al. 2014, Yamamoto, Kawashiri et al. 2015, Di Cesare Mannelli, Maresca et al. 2017, Toyama, Shimoyama et al. 2017). Néanmoins, il est à noter que ces travaux évaluent les effets aigus de la DU, et concernent donc une seule injection de DU. Enfin, la toxicité de la DU sur la viabilité de neuroblastomes humains SHY-SY5Y a été montrée pour une concentration de 20μM, correspondant à près de 6mg/kg (Engel, de Oliveira et al. 2018).

Dans notre étude, une dose de 8mg/kg/injection correspond à une dose cumulée finale de 120 mg/kg. On peut alors suggérer que la DU à forte dose en administration chronique présente des effets délétères qui deviennent morbides par toxicité additive à celle de la CNA-[EPI-DO].

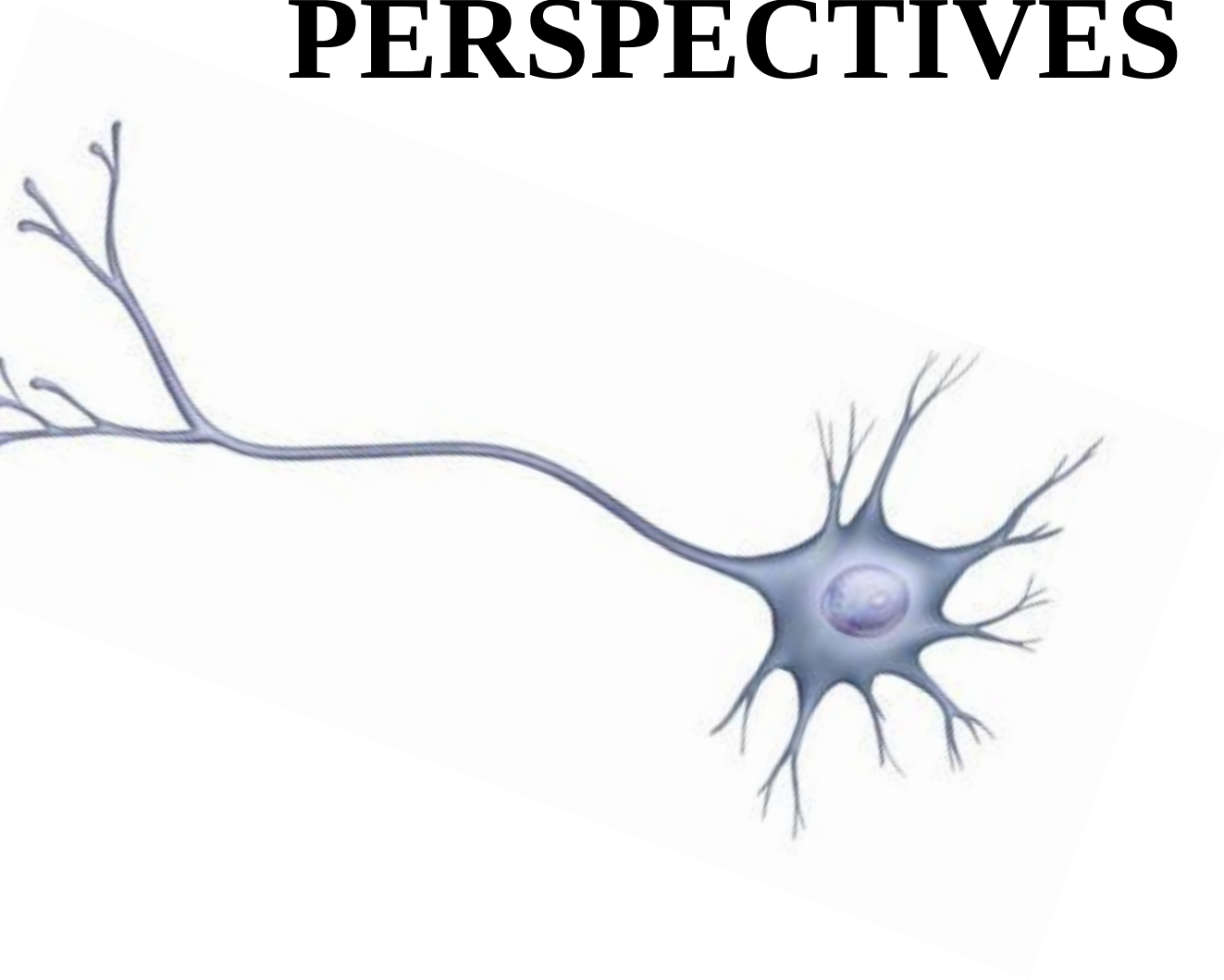
Il est reconnu que les anthracyclines, dont l'épirubicine, sont particulièrement cardiotoxiques (Bonadonna et al. 1993, Morris and Hudis 2010). L'administration chronique de DU à forte dose peut éventuellement aggraver les effets négatifs des anthracyclines. En effet, l'hyperstimulation sérotoninergique peut entraîner une affection toxique connue sous le terme de syndrome sérotoninergique. Ce syndrome sérotoninergique est une réaction indésirable potentiellement mortelle, dont les symptômes présentent plusieurs caractéristiques neuroexcitatrices qui comprennent l'hyperactivité autonome avec la présence d'une tachycardie (Gelener et al. 2011).

Les tests cognitifs ont montré que, pour une tâche de reconnaissance spatiale difficile, la DU à 1mg/kg ne permet pas de prévenir le déclin des performances mnésiques induit par la CNA-[EPI-DO], alors que la DU à 2mg/kg est partiellement efficace. Par contre, la DU à 4mg/kg prévient complètement la diminution des performances mnésiques induite par la CNA-[EPI-DO]. De façon intéressante, au cours d'une tâche jugée plus facile, seule la DU à 1mg/kg n'est pas suffisante pour prévenir les déficits cognitifs induits par la CNA-[EPI-DO], alors qu'à 2 et 4mg/kg les performances mnésiques restent identiques à celles observées chez les rates contrôles. Bien que la DU permette de prévenir la toxicité CNA-[EPI-DO]-induite des astrocytes, et ceci quelle que soit la dose utilisée, l'inefficacité de la DU à 1mg/kg dans l'amélioration des performances cognitives pourrait en partie s'expliquer par son incapacité à contrecarrer la toxicité des cellules prolifératives Ki-67 positives dans l'hippocampe : on observe une diminution de 50% du nombre de ces cellules malgré le traitement DU (1mg/kg), alors qu'une dose de 2 ou 4 mg/kg permet une prévention complète. Nos travaux révèlent également que la DU à 2 et 4 mg/kg contrecarre efficacement la diminution du nombre de PO prolifératifs dans le CC et l'hippocampe. Curieusement, alors qu'à 1mg/kg la DU prévient efficacement cette toxicité dans le CC, cette dose n'est pas suffisante pour une prévention totale dans l'hippocampe où on observe une diminution de 60% du nombre de PO.

Finalement, ces résultats suggèrent également que, par rapport au corps calleux, les atteintes de l'hippocampe sont impliquées de façon plus importante dans les déficits cognitifs observés.

Dans ce travail de thèse, alors qu'à partir de 2mg/kg/injection la DU permet de contrer l'augmentation de cellules leucocytaires CD45 positives au sein du SNC, une dose de 1mg/kg/injection n'est pas suffisante pour lutter contre ce processus. Ceci pourrait également expliquer l'inefficacité de la DU à 1mg/kg pour prévenir la toxicité des cellules prolifératives suite à l'administration de la CNA-[EPI-DO]. En effet, différents travaux s'accordent sur le fait que l'activité neuroprotectrice de la DU semble être sous-tendue par des mécanismes antioxydants via l'augmentation de l'expression d'enzymes antioxydantes (Lee, Park et al. 2016) et antagonisant ainsi la surproduction de ROS (Engel, de Oliveira et al. 2018), mais également anti-inflammatoires, avec une diminution de l'activation microgliale et astrocytaire accompagnée d'une diminution des niveaux de TNF- α et d'IL-1 β dans les régions hippocampiques (Choi, Park et al. 2015, Lee, Park et al. 2016, Park and Lee 2018). Une étude montre que l'activation des récepteurs à la sérotonine sur les monocytes permet de diminuer le relargage de TNF- α induit par le LPS (Durk, Panther et al. 2005). Ceci suggère que la sérotonine est impliquée dans les processus anti-inflammatoires, et que la DU, qui augmente les taux de sérotonine, peut exercer des effets anti-inflammatoires. Une autre étude plus récente démontre également que l'administration de DU à 3, 10 et 30 mg/kg est liée à une diminution du taux de TNF- α et une augmentation du taux d'IL-10 dans le sérum de souris (Ohgi, Futamura et al. 2013), qui est connue comme étant une cytokine anti-inflammatoire essentielle pour inhiber la production de TNF- α et d'IL-6 (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991).

CONCLUSIONS Et PERSPECTIVES



En conclusion, ce travail de thèse a permis de générer et de caractériser pour la première fois un modèle animal pertinent de troubles neurologiques périphériques et centraux évoqués par la CNA-[EPI-DO], fréquemment utilisée dans le traitement du cancer du sein. Ce modèle a été utilisé pour révéler l'efficacité d'un traitement concomitant de duloxétine et d'allopregnanolone (DUAP) contre les symptômes périphériques. Nos travaux montrent également que la DU exerce une action efficace contre les déficits cognitifs évoqués par la CNA-[EPI-DO] chez l'animal, mais les doses efficaces, bien que modérées, restent encore susceptibles de provoquer une toxicité à long terme.

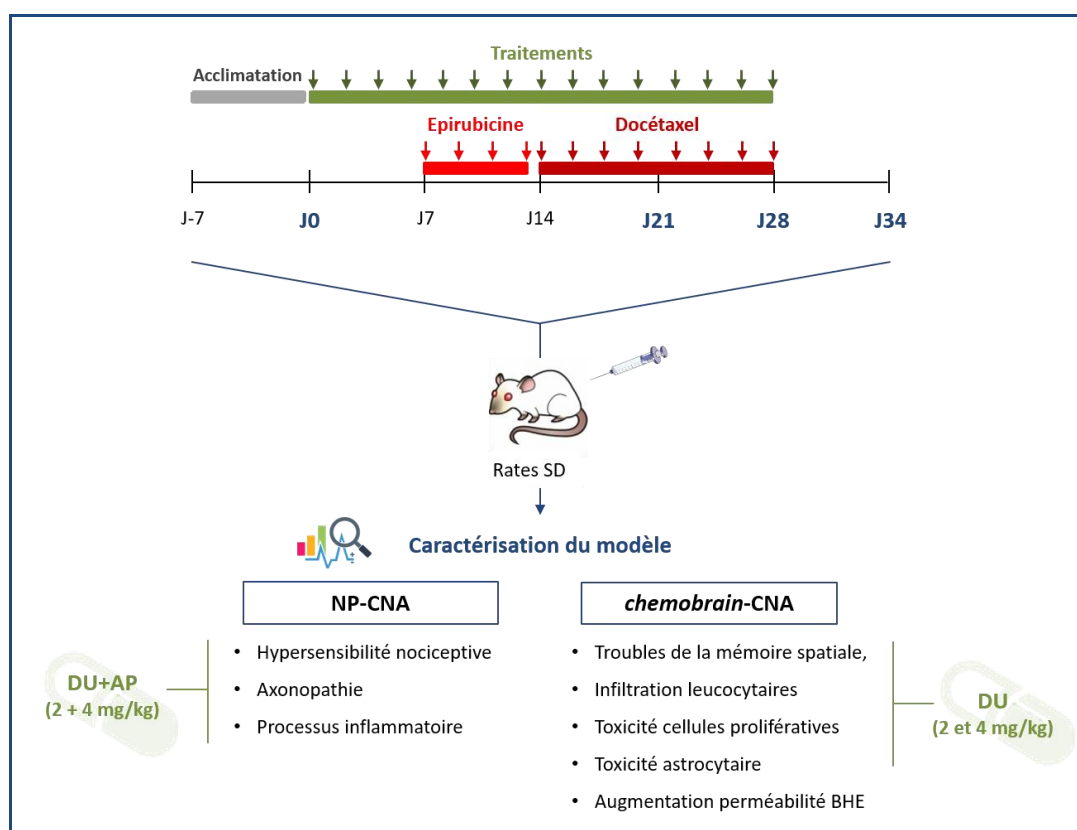


Figure 54 : Conceptualisation des principaux résultats obtenus

L'élaboration et la caractérisation d'un modèle murin (rates Sprague Dawley ou SD) de troubles neurologiques induits par la CNA-[EPI-DO] a permis de mettre en évidence des effets bénéfiques de la combinaison concomitante de duloxétine (DU) et d'allopregnanolone (AP) (stratégie combinatoire DUAP) contre la NP-CNA, et ceux de différentes doses de DU pour prévenir l'apparition des atteintes centrales.

L'ensemble de ces données expérimentales ouvrent des perspectives prometteuses à explorer pour le développement de stratégies efficaces contre les altérations neurophysiologiques périphériques et centrales évoquées par la CNA. En particulier, nous envisageons dans nos perspectives de poursuivre sur deux principaux axes :

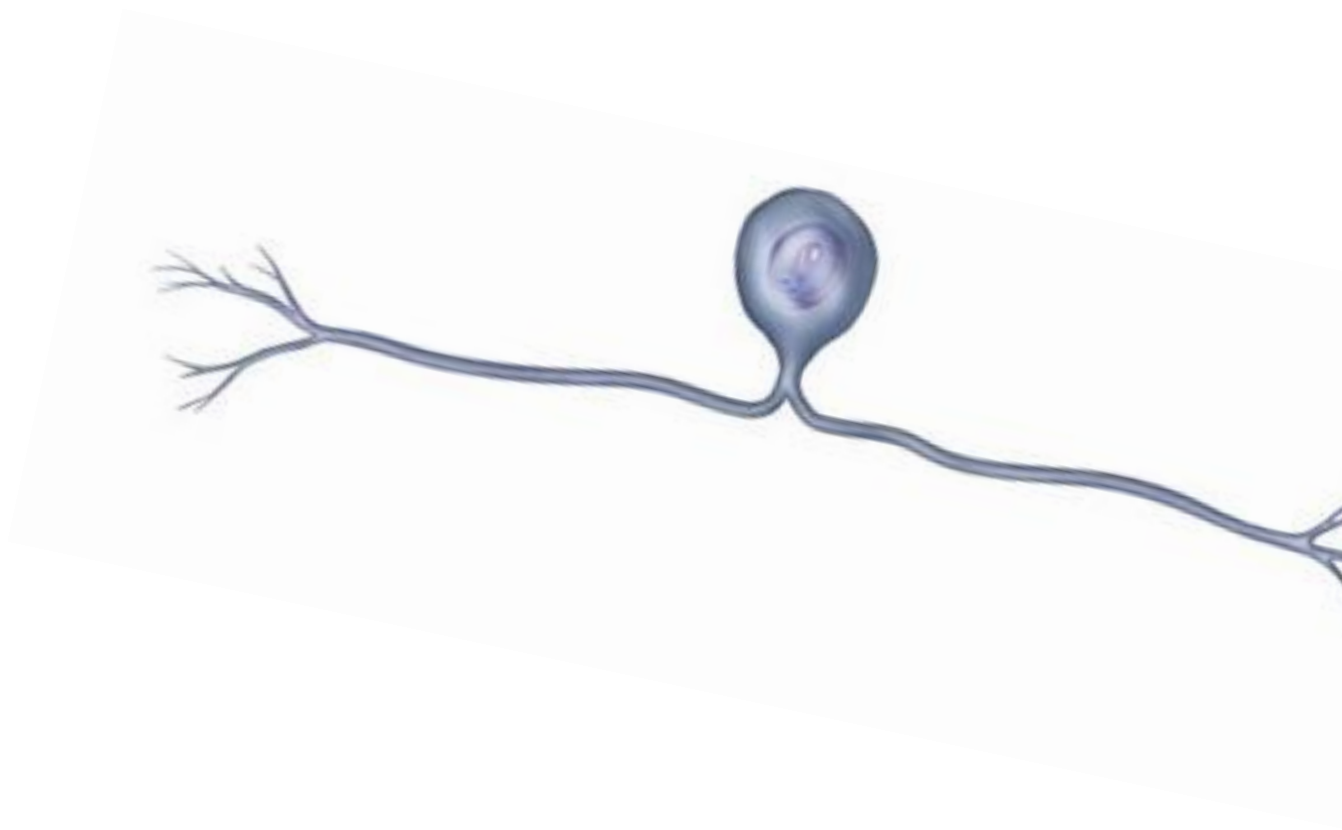
(i) Le premier axe concerne l'élucidation plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'induction des effets de la CNA. Pour offrir de meilleures possibilités dans la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques mieux adaptées et ciblées, la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogenèse, en particulier au niveau central, est indispensable. Pour mieux comprendre les mécanismes, un des premiers points abordés sera l'étude plus détaillée des altérations de la BHE induites par la CNA. L'évaluation du niveau d'expression de certaines protéines des jonctions serrées, telles que la ZO-1 ou la claudine-5, permettra de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'augmentation du passage paracellulaire de la BHE induite par la CNA-[EPI-DO]. Le passage transcellulaire des agents antinéoplasiques à travers la BHE est également extrêmement contrôlé, et constitue un obstacle important empêchant l'entrée des agents chimiothérapeutiques dans le SNC (Fellner, Bauer et al. 2002). En effet, les cellules endothéliales constituant la BHE expriment des pompes d'efflux transcellulaire appartenant à la famille des transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC transporteurs). Ces transporteurs, dont la glycoprotéine P (P-gp), aussi connus sous le nom de MDR1, permettent le reflux vers la lumière du capillaire des agents chimiothérapeutiques, les empêchant ainsi d'atteindre le SNC (Schinkel 1999, Fellner, Bauer et al. 2002). Cette voie de passage n'a pas été évaluée dans nos travaux, et à notre connaissance aucune étude préclinique n'évalue l'expression des transporteurs P-gp sous l'influence de la chimiothérapie. Il s'agira donc d'étudier si les niveaux d'expression de ce transporteur constituant un frein important d'entrée dans le SNC sont altérés par la CNA-[EPI-DO].

Nous avons également effectué des études préliminaires sur une neuro-inflammation CNA-[EPI-DO]-induite. Il s'agira par la suite d'effectuer une évaluation cinétique des concentrations sériques de cytokines pro- et anti-inflammatoires pour mieux étudier l'hypothèse de l'inflammation périphérique induite par la chimiothérapie. Ce travail de thèse révèle également une augmentation de cellules leucocytaires au sein du SNC sous l'effet de la CNA-[EPI-DO] ; l'identification des cellules immunitaires infiltrantes sera effectuée par différents marquages spécifiques des différents types de cellules immunitaires (microglie, lymphocyte, macrophage...).

Enfin, nous avons observé une toxicité des cellules PO par la chimiothérapie, mais nous n'avons pas évalué la possible toxicité des cellules matures myélinisantes. Nous envisageons de poursuivre l'étude de la toxicité cellulaire par une analyse de la myéline et des cellules oligodendrocytaires du SNC.

(ii) Le deuxième axe de nos perspectives s'intéressera davantage à l'évaluation de l'efficacité de nouvelles solutions thérapeutiques en mettant à profit les données que nous obtiendrons à partir de nos travaux visant l'élucidation plus approfondie des mécanismes impliqués dans la neurotoxicité (périphérique et centrale) évoquée par la CNA-[EPI-DO]. A l'appui des résultats déjà obtenus, nous commencerons par une évaluation de l'efficacité du composé BR297 (seul ou combiné avec la DU) à prévenir ou à contrecarrer les symptômes neurologiques induits par la CNA-[EPI-DO]. Le BR297 est l'un des quatre nouveaux analogues de l'AP brevetés par les chercheurs de notre Laboratoire (brevet numéro WO 2012127176 A1 et US 2014/0058079 A1). Contrairement à l'AP et à ses analogues BR053 (12-Oxo-épi-AP), BR338 (12-Oxo-AP) et BR351 (O-allyl-AP), le BR297 (O-allyl-épi-AP) n'induit aucune action prolifératrice dans de nombreux modèles cellulaires testés alors qu'il exerce un puissant effet neuroprotecteur contre la mort cellulaire provoquée par le stress

oxydant (Meyer, Patte-Mensah et al. 2010, Karout, Miesch et al. 2016, Taleb, Patte-Mensah et al. 2018). Nos travaux ultérieurs permettront donc de vérifier si le BR297 serait capable de prévenir/contrecarrer sélectivement la neurotoxicité et les symptômes induits par CNA-[EPI-DO] sans provoquer de prolifération cellulaire qui est une contre-indication majeure chez les patients cancéreux. Ces travaux permettront de sécuriser encore davantage les pistes thérapeutiques explorées dans notre modèle animal pour ensuite envisager sereinement la translation de nos données positives/prometteuses en clinique humaine grâce à l'accompagnement des neurologues du centre d'investigation clinique de Strasbourg qui sont également membres de notre Unité de Recherche.



BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N. J. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." *J Anat* **200**(6): 629-638.
- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* **37**(1): 13-25.
- Abraham, J., M. W. Haut, M. T. Moran, S. Filburn, S. Lemieux and H. Kuwabara (2008). "Adjuvant chemotherapy for breast cancer: effects on cerebral white matter seen in diffusion tensor imaging." *Clin Breast Cancer* **8**(1): 88-91.
- Adelsberger, H., S. Quasthoff, J. Grosskreutz, A. Lepier, F. Eckel and C. Lersch (2000). "The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons." *Eur J Pharmacol* **406**(1): 25-32.
- Adeosun, S. O., X. Hou, Y. Jiao, B. Zheng, S. Henry, R. Hill, Z. He, A. Pani, P. Kyle, X. Ou, T. Mosley, J. M. Farley, C. Stockmeier, I. Paul, S. Bigler, R. D. Brinton, R. Smeyne and J. M. Wang (2012). "Allopregnanolone reinstates tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and motor performance in an MPTP-lesioned mouse model of Parkinson's disease." *PLoS One* **7**(11): e50040.
- Ahles, T. A. (2012). "Brain vulnerability to chemotherapy toxicities." *Psychooncology* **21**(11): 1141-1148.
- Ahles, T. A. and A. J. Saykin (2002). "Breast cancer chemotherapy-related cognitive dysfunction." *Clin Breast Cancer* **3 Suppl 3**: S84-90.
- Al-Atiyyat, N. and A. Obaid (2017). "Management of peripheral neuropathy induced by chemotherapy in adults with cancer: a review." *Int J Palliat Nurs* **23**(1): 13-17.
- Al Moundhri, M. S., S. Al-Salam, A. Al Mahrouqee, S. Beegam and B. H. Ali (2013). "The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies." *J Med Toxicol* **9**(1): 25-33.
- Alizadeh, A., S. M. Dyck and S. Karimi-Abdolrezaee (2015). "Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects." *Front Mol Neurosci* **8**: 35.
- Allen, T. A. and N. J. Fortin (2013). "The evolution of episodic memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110 Suppl 2**: 10379-10386.
- Alvarez, J., F. L. Meyer, D. L. Granoff and A. Lundy (2013). "The effect of EEG biofeedback on reducing postcancer cognitive impairment." *Integr Cancer Ther* **12**(6): 475-487.
- Alvarez, J. I., A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonniere, M. Bernard, J. van Horssen, H. E. de Vries, F. Charron and A. Prat (2011). "The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence." *Science* **334**(6063): 1727-1731.
- Amaya, F., K. Oh-hashii, Y. Naruse, N. Iijima, M. Ueda, G. Shimosato, M. Tominaga, Y. Tanaka and M. Tanaka (2003). "Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons." *Brain Res* **963**(1-2): 190-196.
- Andre, N., D. Braguer, G. Brasseur, A. Goncalves, D. Lemesle-Meunier, S. Guise, M. A. Jordan and C. Briand (2000). "Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells." *Cancer Res* **60**(19): 5349-5353.
- Arendt, T. (2003). "Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity." *Prog Neurobiol* **71**(2-3): 83-248.
- Argyriou, A. A., J. Bruna, P. Marmiroli and G. Cavaletti (2012). "Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update." *Crit Rev Oncol Hematol* **82**(1): 51-77.
- Argyriou, A. A., A. P. Kyritsis, T. Makatsoris and H. P. Kalofonos (2014). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature." *Cancer Manag Res* **6**: 135-147.
- Arrieta, O., N. Hernandez-Pedro, M. C. Fernandez-Gonzalez-Aragon, D. Saavedra-Perez, A. D. Campos-Parra, M. A. Rios-Trejo, T. Ceron-Lizarraga, L. Martinez-Barrera, B. Pineda, G. Ordóñez, A.

- Ortiz-Plata, V. Granados-Soto and J. Sotelo (2011). "Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer." *Neurology* **77**(10): 987-995.
- Arruda-Carvalho, M., M. Sakaguchi, K. G. Akers, S. A. Josselyn and P. W. Frankland (2011). "Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories." *J Neurosci* **31**(42): 15113-15127.
- Asplund, C. L., J. J. Todd, A. P. Snyder and R. Marois (2010). "A central role for the lateral prefrontal cortex in goal-directed and stimulus-driven attention." *Nat Neurosci* **13**(4): 507-512.
- Authier, N., J. P. Gillet, J. Fialip, A. Eschalier and F. Coudore (2000). "Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats." *Brain Res* **887**(2): 239-249.
- Authier, N., J. P. Gillet, J. Fialip, A. Eschalier and F. Coudore (2003). "A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy." *Neurotoxicology* **24**(6): 797-805.
- Bakogeorgos, M. and V. Georgoulas (2017). "Risk-reduction and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Expert Rev Anticancer Ther* **17**(11): 1045-1060.
- Balayssac, D., B. Ling, J. Ferrier, B. Pereira, A. Eschalier and N. Authier (2014). "Assessment of thermal sensitivity in rats using the thermal place preference test: description and application in the study of oxaliplatin-induced acute thermal hypersensitivity and inflammatory pain models." *Behav Pharmacol* **25**(2): 99-111.
- Ballabh, P., A. Braun and M. Nedergaard (2004). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." *Neurobiol Dis* **16**(1): 1-13.
- Banks, W. A. (2004). "Neuroimmune networks and communication pathways: the importance of location." *Brain Behav Immun* **18**(2): 120-122.
- Banks, W. A. and M. A. Erickson (2010). "The blood-brain barrier and immune function and dysfunction." *Neurobiol Dis* **37**(1): 26-32.
- Banks, W. A., A. J. Kastin and D. A. Durham (1989). "Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier." *Brain Res Bull* **23**(6): 433-437.
- Banks, W. A., A. J. Kastin and C. A. Ehrensing (1994). "Blood-borne interleukin-1 alpha is transported across the endothelial blood-spinal cord barrier of mice." *J Physiol* **479** (Pt 2): 257-264.
- Banks, W. A., A. J. Kastin and E. G. Gutierrez (1993). "Interleukin-1 alpha in blood has direct access to cortical brain cells." *Neurosci Lett* **163**(1): 41-44.
- Barker, G. R., F. Bird, V. Alexander and E. C. Warburton (2007). "Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex." *J Neurosci* **27**(11): 2948-2957.
- Barriere, D. A., J. Rieusset, D. Chanteranne, J. Busserolles, M. A. Chauvin, L. Chapuis, J. Salles, C. Dubray and B. Morio (2012). "Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization." *Pain* **153**(3): 553-561.
- Barton, D. L., E. J. Wos, R. Qin, B. I. Mattar, N. B. Green, K. S. Lanier, J. D. Bearden, 3rd, J. W. Kugler, K. L. Hoff, P. S. Reddy, K. M. Rowland, Jr., M. Riepl, B. Christensen and C. L. Loprinzi (2011). "A double-blind, placebo-controlled trial of a topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCTG trial N06CA." *Support Care Cancer* **19**(6): 833-841.
- Batandier, C., X. Leverve and E. Fontaine (2004). "Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I." *J Biol Chem* **279**(17): 17197-17204.
- Baune, B. T., R. Miller, J. McAfoose, M. Johnson, F. Quirk and D. Mitchell (2010). "The role of cognitive impairment in general functioning in major depression." *Psychiatry Res* **176**(2-3): 183-189.
- Beijers, A., F. Mols, W. Dercksen, C. Driessen and G. Vreugdenhil (2014). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and impact on quality of life 6 months after treatment with chemotherapy." *J Community Support Oncol* **12**(11): 401-406.
- Bennett, G. J., G. K. Liu, W. H. Xiao, H. W. Jin and C. Siau (2011). "Terminal arbor degeneration--a novel lesion produced by the antineoplastic agent paclitaxel." *Eur J Neurosci* **33**(9): 1667-1676.

- Berg, A., J. Zelano, M. Pekna, U. Wilhelmsson, M. Pekny and S. Cullheim (2013). "Axonal regeneration after sciatic nerve lesion is delayed but complete in GFAP- and vimentin-deficient mice." *PLoS One* **8**(11): e79395.
- Bergouignan, L., J. P. Lefranc, M. Chupin, N. Morel, J. P. Spano and P. Fossati (2011). "Breast cancer affects both the hippocampus volume and the episodic autobiographical memory retrieval." *PLoS One* **6**(10): e25349.
- Berthier, M. L., J. Hinojosa, C. Martin Mdel and I. Fernandez (2003). "Open-label study of donepezil in chronic poststroke aphasia." *Neurology* **60**(7): 1218-1219.
- Bhat, R., R. Axtell, A. Mitra, M. Miranda, C. Lock, R. W. Tsien and L. Steinman (2010). "Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(6): 2580-2585.
- Bigotte, L. and Y. Olsson (1989). "Distribution and toxic effects of intravenously injected epirubicin on the central nervous system of the mouse." *Brain* **112** (Pt 2): 457-469.
- Black, S. E., R. Doody, H. Li, T. McRae, K. M. Jambor, Y. Xu, Y. Sun, C. A. Perdomo and S. Richardson (2007). "Donepezil preserves cognition and global function in patients with severe Alzheimer disease." *Neurology* **69**(5): 459-469.
- Blier, P. and C. Bouchard (1994). "Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs." *Br J Pharmacol* **113**(2): 485-495.
- Bompaire, F., T. Durand, I. Leger-Hardy, D. Psimaras and D. Ricard (2017). "Chemotherapy-related cognitive impairment or << chemobrain >>: concept and state of art." *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* **15**(1): 89-98.
- Bonadonna, G., L. Gianni, A. Santoro, V. Bonfante, P. Bidoli, P. Casali, R. Demicheli and P. Valagussa (1993). "Drugs ten years later: epirubicin." *Ann Oncol* **4**(5): 359-369.
- Bora, E., B. J. Harrison, M. Yucel and C. Pantelis (2013). "Cognitive impairment in euthymic major depressive disorder: a meta-analysis." *Psychol Med* **43**(10): 2017-2026.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." *J Natl Cancer Inst* **92**(16): 1295-1302.
- Bortolato, B., A. F. Carvalho and R. S. McIntyre (2014). "Cognitive dysfunction in major depressive disorder: a state-of-the-art clinical review." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **13**(10): 1804-1818.
- Boyette-Davis, J. and P. M. Dougherty (2011). "Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline." *Exp Neurol* **229**(2): 353-357.
- Boyette-Davis, J. A., E. T. Walters and P. M. Dougherty (2015). "Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy." *Pain Manag* **5**(4): 285-296.
- Bradl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* **119**(1): 37-53.
- Brenner, D. S., J. P. Golden and R. W. t. Gereau (2012). "A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice." *PLoS One* **7**(6): e39765.
- Brewer, J. R., G. Morrison, M. E. Dolan and G. F. Fleming (2016). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Current status and progress." *Gynecol Oncol* **140**(1): 176-183.
- Brezden, C. B., K. A. Phillips, M. Abdoell, T. Bunston and I. F. Tannock (2000). "Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy." *J Clin Oncol* **18**(14): 2695-2701.
- Briones, T. L. and J. Woods (2011). "Chemotherapy-induced cognitive impairment is associated with decreases in cell proliferation and histone modifications." *BMC Neurosci* **12**: 124.
- Briones, T. L. and J. Woods (2014). "Dysregulation in myelination mediated by persistent neuroinflammation: possible mechanisms in chemotherapy-related cognitive impairment." *Brain Behav Immun* **35**: 23-32.
- Burgos, E., D. Gomez-Nicola, D. Pascual, M. I. Martin, M. Nieto-Sampedro and C. Goicoechea (2012). "Cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents the development of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. Possible involvement of spinal glial cells." *Eur J Pharmacol* **682**(1-3): 62-72.
- Busserolles, J., C. Tsantoulas, A. Eschalier and J. A. Lopez Garcia (2016). "Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas." *Pain* **157 Suppl 1**: S7-14.

- Bymaster, F. P., T. C. Lee, M. P. Knadler, M. J. Detke and S. Iyengar (2005). "The dual transporter inhibitor duloxetine: a review of its preclinical pharmacology, pharmacokinetic profile, and clinical results in depression." *Curr Pharm Des* **11**(12): 1475-1493.
- Callaghan, B. C., R. S. Price and E. L. Feldman (2015). "Distal Symmetric Polyneuropathy: A Review." *JAMA* **314**(20): 2172-2181.
- Callaghan, C. K. and S. M. O'Mara (2015). "Long-term cognitive dysfunction in the rat following docetaxel treatment is ameliorated by the phosphodiesterase-4 inhibitor, rolipram." *Behav Brain Res* **290**: 84-89.
- Campbell, M., A. S. Kiang, P. F. Kenna, C. Kerskens, C. Blau, L. O'Dwyer, A. Tivnan, J. A. Kelly, B. Brankin, G. J. Farrar and P. Humphries (2008). "RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier." *J Gene Med* **10**(8): 930-947.
- Cardoso, S., R. X. Santos, C. Carvalho, S. Correia, G. C. Pereira, S. S. Pereira, P. J. Oliveira, M. S. Santos, T. Proenca and P. I. Moreira (2008). "Doxorubicin increases the susceptibility of brain mitochondria to Ca(2+)-induced permeability transition and oxidative damage." *Free Radic Biol Med* **45**(10): 1395-1402.
- Carozzi, V. A., A. Canta and A. Chiorazzi (2015). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms?" *Neurosci Lett* **596**: 90-107.
- Carozzi, V. A., A. Canta, N. Oggioni, B. Sala, A. Chiorazzi, C. Meregalli, M. Bossi, P. Marmiroli and G. Cavaletti (2010). "Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies." *Exp Neurol* **226**(2): 301-309.
- Cata, J. P., H. R. Weng, J. H. Chen and P. M. Dougherty (2006). "Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia." *Neuroscience* **138**(1): 329-338.
- Cata, J. P., H. R. Weng and P. M. Dougherty (2008). "Behavioral and electrophysiological studies in rats with cisplatin-induced chemoneuropathy." *Brain Res* **1230**: 91-98.
- Cavaletti, G., G. Tredici, M. Braga and S. Tazzari (1995). "Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol." *Exp Neurol* **133**(1): 64-72.
- Cervellini, I., E. Bello, R. Frapolli, C. Porretta-Serapiglia, N. Oggioni, A. Canta, R. Lombardi, F. Camozzi, I. Roglio, R. C. Melcangi, M. D'Incalci, G. Lauria, P. Ghezzi, G. Cavaletti and R. Bianchi (2010). "The neuroprotective effect of erythropoietin in docetaxel-induced peripheral neuropathy causes no reduction of antitumor activity in 13762 adenocarcinoma-bearing rats." *Neurotox Res* **18**(2): 151-160.
- Ces, A., T. Burg, K. Herbeaux, C. Heraud, J. B. Bott, A. G. Mensah-Nyagan and C. Mathis (2018). "Age-related vulnerability of pattern separation in C57BL/6J mice." *Neurobiol Aging* **62**: 120-129.
- Chaplan, S. R., F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung and T. L. Yaksh (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." *J Neurosci Methods* **53**(1): 55-63.
- Chappell, A. S., D. Desai, H. Liu-Seifert, S. Zhang, V. Skljarevski, Y. Belenkov and J. P. Brown (2011). "A double-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of duloxetine for the treatment of chronic pain due to osteoarthritis of the knee." *Pain Pract* **11**(1): 33-41.
- Chaudhry, V., E. K. Rowinsky, S. E. Sartorius, R. C. Donehower and D. R. Cornblath (1994). "Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies." *Ann Neurol* **35**(3): 304-311.
- Chen, L., B. Li, B. Chen, Y. Shao, Q. Luo, X. Shi and Y. Chen (2016). "Thymoquinone Alleviates the Experimental Diabetic Peripheral Neuropathy by Modulation of Inflammation." *Sci Rep* **6**: 31656.
- Chen, S., J. M. Wang, R. W. Irwin, J. Yao, L. Liu and R. D. Brinton (2011). "Allopregnanolone promotes regeneration and reduces beta-amyloid burden in a preclinical model of Alzheimer's disease." *PLoS One* **6**(8): e24293.
- Cheung, Y. T., S. R. Lim, H. K. Ho and A. Chan (2013). "Cytokines as mediators of chemotherapy-associated cognitive changes: current evidence, limitations and directions for future research." *PLoS One* **8**(12): e81234.
- Chiaravalloti, N. D. and J. DeLuca (2008). "Cognitive impairment in multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **7**(12): 1139-1151.

- 252

- de Ruiter, M. B., L. Reneman, W. Boogerd, D. J. Veltman, F. S. van Dam, A. J. Nederveen, E. Boven and S. B. Schagen (2011). "Cerebral hypo-responsiveness and cognitive impairment 10 years after chemotherapy for breast cancer." *Hum Brain Mapp* **32**(8): 1206-1219.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." *J Exp Med* **174**(5): 1209-1220.
- del Valle, J., A. Camins, M. Pallas, J. Vilaplana and C. Pelegri (2008). "A new method for determining blood-brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue-Hoechst cocktail." *J Neurosci Methods* **174**(1): 42-49.
- DeLeo, J. A. and M. D. Rutkowski (2000). "Gender differences in rat neuropathic pain sensitivity is dependent on strain." *Neurosci Lett* **282**(3): 197-199.
- Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 339-350.
- Deng, Y., L. Luo, Y. Hu, K. Fang and J. Liu (2016). "Clinical practice guidelines for the management of neuropathic pain: a systematic review." *BMC Anesthesiol* **16**: 12.
- Deprez, S., F. Amant, A. Smeets, R. Peeters, A. Leemans, W. Van Hecke, J. S. Verhoeven, M. R. Christiaens, J. Vandenbergh, M. Vandenbulcke and S. Snaert (2012). "Longitudinal assessment of chemotherapy-induced structural changes in cerebral white matter and its correlation with impaired cognitive functioning." *J Clin Oncol* **30**(3): 274-281.
- Dery, N., A. Goldstein and S. Becker (2015). "A role for adult hippocampal neurogenesis at multiple time scales: A study of recent and remote memory in humans." *Behav Neurosci* **129**(4): 435-449.
- Descoeur, J., V. Pereira, A. Pizzoccaro, A. Francois, B. Ling, V. Maffre, B. Couette, J. Busserolles, C. Courteix, J. Noel, M. Lazdunski, A. Eschalier, N. Authier and E. Bourinet (2011). "Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors." *EMBO Mol Med* **3**(5): 266-278.
- Detke, M. J., Y. Lu, D. J. Goldstein, J. R. Hayes and M. A. Demitrack (2002). "Duloxetine, 60 mg once daily, for major depressive disorder: a randomized double-blind placebo-controlled trial." *J Clin Psychiatry* **63**(4): 308-315.
- Deuis, J. R., L. S. Dvorakova and I. Vetter (2017). "Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents." *Front Mol Neurosci* **10**: 284.
- Di Cesare Mannelli, L., M. Maresca, L. Micheli, C. Farina, M. W. Scherz and C. Ghelardini (2017). "A rat model of FOLFOX-induced neuropathy: effects of oral dimiracetam in comparison with duloxetine and pregabalin." *Cancer Chemother Pharmacol* **80**(6): 1091-1103.
- Dietrich, J., R. Han, Y. Yang, M. Mayer-Proschel and M. Noble (2006). "CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo." *J Biol* **5**(7): 22.
- Dietrich, J., M. Monje, J. Wefel and C. Meyers (2008). "Clinical patterns and biological correlates of cognitive dysfunction associated with cancer therapy." *Oncologist* **13**(12): 1285-1295.
- Dietrich, J., M. Prust and J. Kaiser (2015). "Chemotherapy, cognitive impairment and hippocampal toxicity." *Neuroscience* **309**: 224-232.
- Dimou, L., C. Simon, F. Kirchhoff, H. Takebayashi and M. Gotz (2008). "Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex." *J Neurosci* **28**(41): 10434-10442.
- Dineen, J. and R. Freeman (2015). "Autonomic Neuropathy." *Semin Neurol* **35**(4): 458-468.
- Dong, J. and H. Chen (2018). "Cardiotoxicity of Anticancer Therapeutics." *Front Cardiovasc Med* **5**: 9.
- Dougherty, P. M., J. P. Cata, J. V. Cordella, A. Burton and H. R. Weng (2004). "Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients." *Pain* **109**(1-2): 132-142.
- Doyle, T., Z. Chen, C. Muscoli, L. Bryant, E. Esposito, S. Cuzzocrea, C. Dagostino, J. Ryerse, S. Rausaria, A. Kamadulski, W. L. Neumann and D. Salvemini (2012). "Targeting the overproduction of peroxynitrite for the prevention and reversal of paclitaxel-induced neuropathic pain." *J Neurosci* **32**(18): 6149-6160.

- Dubois, M., N. Lapinte, V. Villier, C. Lecointre, V. Roy, M. C. Tonon, P. Gandolfo, F. Joly, P. Hilber and H. Castel (2014). "Chemotherapy-induced long-term alteration of executive functions and hippocampal cell proliferation: role of glucose as adjuvant." *Neuropharmacology* **79**: 234-248.
- Dubovy, P., I. Klusakova and I. Hradilova Svizenska (2014). "Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury." *Biomed Res Int* **2014**: 691041.
- Duque, A., D. Coman, B. C. Carlyle, K. A. Bordner, E. D. George, X. Papademetris, F. Hyder and A. A. Simen (2012). "Neuroanatomical changes in a mouse model of early life neglect." *Brain Struct Funct* **217**(2): 459-472.
- Durand, J. P., G. Deplanque, V. Montheil, J. M. Gornet, F. Scotte, O. Mir, A. Cessot, R. Coriat, E. Raymond, E. Mitry, P. Herait, Y. Yataghene and F. Goldwasser (2012). "Efficacy of venlafaxine for the prevention and relief of oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: results of EFOF, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial." *Ann Oncol* **23**(1): 200-205.
- Durk, T., E. Panther, T. Muller, S. Sorichter, D. Ferrari, C. Pizzirani, F. Di Virgilio, D. Myrtek, J. Norgauer and M. Idzko (2005). "5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HT subtypes." *Int Immunol* **17**(5): 599-606.
- Eckhoff, L., S. Feddersen, A. S. Knoop, M. Ewertz and T. K. Bergmann (2015). "Docetaxel-induced neuropathy: a pharmacogenetic case-control study of 150 women with early-stage breast cancer." *Acta Oncol* **54**(4): 530-537.
- Eckhoff, L., A. Knoop, M. B. Jensen and M. Ewertz (2015). "Persistence of docetaxel-induced neuropathy and impact on quality of life among breast cancer survivors." *Eur J Cancer* **51**(3): 292-300.
- Eckhoff, L., M. Nielsen, S. Moeller and A. Knoop (2011). "TAXTOX - a retrospective study regarding the side effects of docetaxel given as part of the adjuvant treatment to patients with primary breast cancer in Denmark from 2007 to 2009." *Acta Oncol* **50**(7): 1075-1082.
- Eiermann, W., T. Pienkowski, J. Crown, S. Sadeghi, M. Martin, A. Chan, M. Saleh, S. Sehdev, L. Provencher, V. Semiglazov, M. Press, G. Sauter, M. A. Lindsay, A. Riva, M. Buyse, P. Drevot, H. Taupin and J. R. Mackey (2011). "Phase III study of doxorubicin/cyclophosphamide with concomitant versus sequential docetaxel as adjuvant treatment in patients with human epidermal growth factor receptor 2-normal, node-positive breast cancer: BCIRG-005 trial." *J Clin Oncol* **29**(29): 3877-3884.
- Eiseman, J. L., J. H. Beumer, L. H. Rigatti, S. Strychor, K. Meyers, S. Dienel and C. C. Horn (2015). "Plasma pharmacokinetics and tissue and brain distribution of cisplatin in musk shrews." *Cancer Chemother Pharmacol* **75**(1): 143-152.
- Eisen, T., C. Boshoff, I. Mak, F. Sapunar, M. M. Vaughan, L. Pyle, S. R. Johnston, R. Ahern, I. E. Smith and M. E. Gore (2000). "Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer." *Br J Cancer* **82**(4): 812-817.
- Ekstrom, A. D., J. B. Caplan, E. Ho, K. Shattuck, I. Fried and M. J. Kahana (2005). "Human hippocampal theta activity during virtual navigation." *Hippocampus* **15**(7): 881-889.
- ElBeltagy, M., S. Mustafa, J. Umka, L. Lyons, A. Salman, G. T. Chur-yoe, N. Bhalla, G. Bennett and P. M. Wigmore (2010). "Fluoxetine improves the memory deficits caused by the chemotherapy agent 5-fluorouracil." *Behav Brain Res* **208**(1): 112-117.
- Elovic, E. (2000). "Use of provigil for underarousal following TBI." *J Head Trauma Rehabil* **15**(4): 1068-1071.
- Encinas, J. M., A. Vaahtokari and G. Enikolopov (2006). "Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8233-8238.
- Engel, D. F., J. de Oliveira, V. Lieberknecht, A. L. S. Rodrigues, A. F. de Bem and N. H. Gabilan (2018). "Duloxetine Protects Human Neuroblastoma Cells from Oxidative Stress-Induced Cell Death Through Akt/Nrf-2/HO-1 Pathway." *Neurochem Res* **43**(2): 387-396.
- Ennaceur, A., N. Neave and J. P. Aggleton (1997). "Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix." *Exp Brain Res* **113**(3): 509-519.
- Epp, J. R., A. K. Haack and L. A. Galea (2010). "Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus." *Hippocampus* **20**(7): 866-876.

- Epstein, R. A., E. Z. Patai, J. B. Julian and H. J. Spiers (2017). "The cognitive map in humans: spatial navigation and beyond." *Nat Neurosci* **20**(11): 1504-1513.
- Evtodienko, Y. V., V. V. Teplova, S. S. Sidash, F. Ichas and J. P. Mazat (1996). "Microtubule-active drugs suppress the closure of the permeability transition pore in tumour mitochondria." *FEBS Lett* **393**(1): 86-88.
- F., L. M. G. B. E. F. M. N. N. S. J. (2011). "Impact of adjuvant chemotherapy on cognitive functions in breast cancer: literature review." *Psycho-Oncol*: 5:3-10
- Fabi, A., P. Papaldo, M. S. Pino, G. Ferretti, P. Carlini, U. Pacetti, S. Di Cosimo, C. Nardoni, D. Giannarelli, I. Sacchi and F. Cognetti (2004). "Epirubicin plus docetaxel in metastatic breast cancer: escalating dose does not improve efficacy. A phase II study." *Anticancer Res* **24**(3b): 1963-1967.
- Fanning, A. S., C. M. Van Itallie and J. M. Anderson (2012). "Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia." *Mol Biol Cell* **23**(4): 577-590.
- Fardell, J. E., J. Vardy and I. N. Johnston (2013). "The short and long term effects of docetaxel chemotherapy on rodent object recognition and spatial reference memory." *Life Sci* **93**(17): 596-604.
- Fardell, J. E., J. Vardy, J. D. Shah and I. N. Johnston (2012). "Cognitive impairments caused by oxaliplatin and 5-fluorouracil chemotherapy are ameliorated by physical activity." *Psychopharmacology (Berl)* **220**(1): 183-193.
- Fardell, J. E., J. Zhang, R. De Souza, J. Vardy, I. Johnston, C. Allen, J. Henderson and M. Piquette-Miller (2014). "The impact of sustained and intermittent docetaxel chemotherapy regimens on cognition and neural morphology in healthy mice." *Psychopharmacology (Berl)* **231**(5): 841-852.
- Fehrenbacher, J. C. (2015). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Prog Mol Biol Transl Sci* **131**: 471-508.
- Fellner, S., B. Bauer, D. S. Miller, M. Schaffrik, M. Fankhanel, T. Spruss, G. Bernhardt, C. Graeff, L. Farber, H. Gschaidmeier, A. Buschauer and G. Fricker (2002). "Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo." *J Clin Invest* **110**(9): 1309-1318.
- Ferguson, R. J., T. A. Ahles, A. J. Saykin, B. C. McDonald, C. T. Furstenberg, B. F. Cole and L. A. Mott (2007). "Cognitive-behavioral management of chemotherapy-related cognitive change." *Psychooncology* **16**(8): 772-777.
- Ferguson, R. J., B. C. McDonald, M. A. Rocque, C. T. Furstenberg, S. Horrigan, T. A. Ahles and A. J. Saykin (2012). "Development of CBT for chemotherapy-related cognitive change: results of a waitlist control trial." *Psychooncology* **21**(2): 176-186.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman and F. Bray (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." *Eur J Cancer* **49**(6): 1374-1403.
- Ferrari, L. F., A. Chum, O. Bogen, D. B. Reichling and J. D. Levine (2011). "Role of Drp1, a key mitochondrial fission protein, in neuropathic pain." *J Neurosci* **31**(31): 11404-11410.
- Fields, R. D. (2015). "A new mechanism of nervous system plasticity: activity-dependent myelination." *Nat Rev Neurosci* **16**(12): 756-767.
- Flatters, S. J. and G. J. Bennett (2006). "Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction." *Pain* **122**(3): 245-257.
- Foley, J. J., R. B. Raffa and E. A. Walker (2008). "Effects of chemotherapeutic agents 5-fluorouracil and methotrexate alone and combined in a mouse model of learning and memory." *Psychopharmacology (Berl)* **199**(4): 527-538.
- Fornasari, D. (2017). "Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review." *Pain Ther* **6**(Suppl 1): 25-33.
- Fuster, J. M. (2001). "The prefrontal cortex--an update: time is of the essence." *Neuron* **30**(2): 319-333.
- Gahimer, J., J. Wernicke, I. Yalcin, M. J. Ossanna, M. Wulster-Radcliffe and L. Viktrup (2007). "A retrospective pooled analysis of duloxetine safety in 23,983 subjects." *Curr Med Res Opin* **23**(1): 175-184.
- Gahtan, E. and J. B. Overmier (2001). "Performance more than working memory disrupted by acute systemic inflammation in rats in appetitive tasks." *Physiol Behav* **73**(1-2): 201-210.

- Ganz, P. A., J. E. Bower, L. Kwan, S. A. Castellon, D. H. Silverman, C. Geist, E. C. Breen, M. R. Irwin and S. W. Cole (2013). "Does tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) play a role in post-chemotherapy cerebral dysfunction?" *Brain Behav Immun* **30 Suppl**: S99-108.
- Gauchan, P., T. Andoh, K. Ikeda, M. Fujita, A. Sasaki, A. Kato and Y. Kuraishi (2009). "Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit." *Biol Pharm Bull* **32**(4): 732-734.
- Gelener, P., U. Gorgulu, G. Kutlu, S. Ucler and L. E. Inan (2011). "Serotonin syndrome due to duloxetine." *Clin Neuropharmacol* **34**(3): 127-128.
- Genschaft, M., T. Huebner, F. Plessow, V. N. Ikonomidou, N. Abolmaali, F. Krone, A. Hoffmann, E. Holfeld, P. Vorwerk, C. Kramm, B. Gruhn, E. Koustenis, P. Hernaiz-Driever, R. Mandal, M. Sutorp, T. Hummel, C. Ikonomidou, C. Kirschbaum and M. N. Smolka (2013). "Impact of chemotherapy for childhood leukemia on brain morphology and function." *PLoS One* **8**(11): e78599.
- Gewandter, J. S., S. G. Mohile, C. E. Heckler, J. L. Ryan, J. J. Kirshner, P. J. Flynn, J. O. Hopkins and G. R. Morrow (2014). "A phase III randomized, placebo-controlled study of topical amitriptyline and ketamine for chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): a University of Rochester CCOP study of 462 cancer survivors." *Support Care Cancer* **22**(7): 1807-1814.
- Ghelardini, C., C. Menicacci, D. Cerretani and E. Bianchi (2014). "Spinal administration of mGluR5 antagonist prevents the onset of bortezomib induced neuropathic pain in rat." *Neuropharmacology* **86**: 294-300.
- Ghezzi, P., E. D. Santo, S. Sacco, C. Foddi, M. L. Barbaccia and T. Mennini (2000). "Neurosteroid levels are increased in vivo after LPS treatment and negatively regulate LPS-induced TNF production." *Eur Cytokine Netw* **11**(3): 464-469.
- Gilardini, A., R. L. Avila, N. Oggioni, V. Rodriguez-Menendez, M. Bossi, A. Canta, G. Cavaletti and D. A. Kirschner (2012). "Myelin structure is unaltered in chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Neurotoxicology* **33**(1): 1-7.
- Goble, S. and H. D. Bear (2003). "Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions." *Surg Clin North Am* **83**(4): 943-971.
- Goldstein, D. J., Y. Lu, M. J. Detke, T. C. Lee and S. Iyengar (2005). "Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy." *Pain* **116**(1-2): 109-118.
- Gornstein, E. and T. L. Schwarz (2014). "The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions." *Neuropharmacology* **76 Pt A**: 175-183.
- Gosselet, F., P. Candela, R. Cecchelli and L. Fenart (2011). "[Role of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease]." *Med Sci (Paris)* **27**(11): 987-992.
- Gosselin, R. D., M. R. Suter, R. R. Ji and I. Decosterd (2010). "Glial cells and chronic pain." *Neuroscientist* **16**(5): 519-531.
- Gotz, M. E. and P. Riederer (2004). "Advances in neuroprotection research for neurodegenerative diseases." *Adv Exp Med Biol* **541**: 1-19.
- Greer, T. L., P. Sunderajan, B. D. Grannemann, B. T. Kurian and M. H. Trivedi (2014). "Does duloxetine improve cognitive function independently of its antidepressant effect in patients with major depressive disorder and subjective reports of cognitive dysfunction?" *Depress Res Treat* **2014**: 627863.
- Gregorios, J. B., A. B. Gregorios, J. Mora, A. Marcillo, R. M. Fojaco and B. Green (1989). "Morphologic alterations in rat brain following systemic and intraventricular methotrexate injection: light and electron microscopic studies." *J Neuropathol Exp Neurol* **48**(1): 33-47.
- Grewal, A. K., A. S. Jaggi, A. C. Rana and N. Singh (2013). "Effect of neurosteroid modulation on global ischaemia-reperfusion-induced cerebral injury in mice." *Korean J Physiol Pharmacol* **17**(6): 485-491.
- Griffith, K. A., D. J. Couture, S. Zhu, N. Pandya, M. E. Johantgen, G. Cavaletti, J. M. Davenport, L. J. Tanguay, A. Choflet, T. Milliron, E. Glass, N. Gambill, C. L. Renn and S. G. Dorsey (2014). "Evaluation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy using current perception threshold and clinical evaluations." *Support Care Cancer* **22**(5): 1161-1169.

- Grisold, W., G. Cavaletti and A. J. Windebank (2012). "Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention." *Neuro Oncol* **14 Suppl 4**: iv45-54.
- Grzegorski, T. and J. Losy (2017). "Cognitive impairment in multiple sclerosis - a review of current knowledge and recent research." *Rev Neurosci* **28**(8): 845-860.
- Guennoun, R., F. Labombarda, M. C. Gonzalez Deniselle, P. Liere, A. F. De Nicola and M. Schumacher (2015). "Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection." *J Steroid Biochem Mol Biol* **146**: 48-61.
- Gutierrez, E. G., W. A. Banks and A. J. Kastin (1993). "Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse." *J Neuroimmunol* **47**(2): 169-176.
- Haim, N., R. Epelbaum, M. Ben-Shahar, D. Yarnitsky, W. Simri and E. Robinson (1994). "Full dose vincristine (without 2-mg dose limit) in the treatment of lymphomas." *Cancer* **73**(10): 2515-2519.
- Hainsworth, J. D., D. A. Yardley, D. R. Spigel, A. A. Meluch, D. Rinaldi, F. M. Schnell and F. A. Greco (2006). "Docetaxel and epirubicin as first-line treatment for patients with metastatic breast cancer: a Minnie Pearl Cancer Research Network Phase II trial." *Cancer Invest* **24**(5): 469-473.
- Hald, A. (2009). "Spinal astrogliosis in pain models: cause and effects." *Cell Mol Neurobiol* **29**(5): 609-619.
- Hamanaka, R. B. and N. S. Chandel (2010). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes." *Trends Biochem Sci* **35**(9): 505-513.
- Hammack, J. E., J. C. Michalak, C. L. Loprinzi, J. A. Sloan, P. J. Novotny, G. S. Soori, M. T. Tirona, K. M. Rowland, Jr., P. J. Stella and J. A. Johnson (2002). "Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cis-platinum-induced peripheral neuropathy." *Pain* **98**(1-2): 195-203.
- Han, R., Y. M. Yang, J. Dietrich, A. Luebke, M. Mayer-Proschel and M. Noble (2008). "Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system." *J Biol* **7**(4): 12.
- Han, Y. and M. T. Smith (2013). "Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)." *Front Pharmacol* **4**: 156.
- Hancock, B. W. and A. Naysmith (1975). "Vincristine-induced autonomic neuropathy." *Br Med J* **3**(5977): 207.
- Hanisch, U. K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." *Nat Neurosci* **10**(11): 1387-1394.
- Hansen, N., N. Uceyler, F. Palm, M. Zelenka, L. Biko, K. P. Lesch, M. Gerlach and C. Sommer (2011). "Serotonin transporter deficiency protects mice from mechanical allodynia and heat hyperalgesia in vincristine neuropathy." *Neurosci Lett* **495**(2): 93-97.
- Hara, T., T. Chiba, K. Abe, A. Makabe, S. Ikeno, K. Kawakami, I. Utsunomiya, T. Hama and K. Taguchi (2013). "Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion." *Pain* **154**(6): 882-889.
- Hayashi, Y., M. Nomura, S. Yamagishi, S. Harada, J. Yamashita and H. Yamamoto (1997). "Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes." *Glia* **19**(1): 13-26.
- Hayslip, J., E. V. Dressler, H. Weiss, T. J. Taylor, M. Chambers, T. Noel, S. Miriyala, J. T. Keeney, X. Ren, R. Sultana, M. Vore, D. A. Butterfield, D. St Clair and J. A. Moscow (2015). "Plasma TNF-alpha and Soluble TNF Receptor Levels after Doxorubicin with or without Co-Administration of Mesna-A Randomized, Cross-Over Clinical Study." *PLoS One* **10**(4): e0124988.
- Hermelink, K., M. Untch, M. P. Lux, R. Kreienberg, T. Beck, I. Bauerfeind and K. Munzel (2007). "Cognitive function during neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: results of a prospective, multicenter, longitudinal study." *Cancer* **109**(9): 1905-1913.
- Herrera-Guzman, I., E. Gudayol-Ferre, J. E. Herrera-Abarca, D. Herrera-Guzman, P. Montelongo-Pedraza, F. Padros Blazquez, M. Pero-Cebollero and J. Guardia-Olmos (2010). "Major Depressive Disorder in recovery and neuropsychological functioning: effects of selective serotonin reuptake inhibitor and dual inhibitor depression treatments on residual cognitive deficits in patients with Major Depressive Disorder in recovery." *J Affect Disord* **123**(1-3): 341-350.

- Herrera-Guzman, I., J. E. Herrera-Abarca, E. Gudayol-Ferre, D. Herrera-Guzman, L. Gomez-Carbajal, M. Pena-Olvira, E. Villuendas-Gonzalez and G. O. Joan (2010). "Effects of selective serotonin reuptake and dual serotonergic-noradrenergic reuptake treatments on attention and executive functions in patients with major depressive disorder." *Psychiatry Res* **177**(3): 323-329.
- Hershman, D. L., C. Lacchetti and C. L. Loprinzi (2014). "Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary." *J Oncol Pract* **10**(6): e421-e424.
- Hirayama, Y., K. Ishitani, Y. Sato, S. Iyama, K. Takada, K. Murase, H. Kuroda, Y. Nagamachi, Y. Konuma, A. Fujimi, T. Sagawa, K. Ono, H. Horiguchi, T. Terui, K. Koike, T. Kusakabe, T. Sato, R. Takimoto, M. Kobune and J. Kato (2015). "Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial." *Int J Clin Oncol* **20**(5): 866-871.
- Hoke, A. and M. Ray (2014). "Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *ILAR J* **54**(3): 273-281.
- Honda, M., K. Uchida, M. Tanabe and H. Ono (2006). "Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT_{2A/2C} receptors." *Neuropharmacology* **51**(4): 866-872.
- Hou, X., R. Zhang, J. Wang, Y. Li, F. Li, Y. Zhang, X. Zheng, Y. Shen, Y. Wang and L. Zhou (2018). "CLC-2 is a positive modulator of oligodendrocyte precursor cell differentiation and myelination." *Mol Med Rep* **17**(3): 4515-4523.
- Huang, K., D. Bian, B. Jiang, Q. Zhai, N. Gao and R. Wang (2017). "TRPA1 contributed to the neuropathic pain induced by docetaxel treatment." *Cell Biochem Funct* **35**(3): 141-143.
- Huang, Z. Z., D. Li, C. C. Liu, Y. Cui, H. Q. Zhu, W. W. Zhang, Y. Y. Li and W. J. Xin (2014). "CX3CL1-mediated macrophage activation contributed to paclitaxel-induced DRG neuronal apoptosis and painful peripheral neuropathy." *Brain Behav Immun* **40**: 155-165.
- Huehnchen, P., W. Boehmerle, A. Springer, D. Freyer and M. Endres (2017). "A novel preventive therapy for paclitaxel-induced cognitive deficits: preclinical evidence from C57BL/6 mice." *Transl Psychiatry* **7**(8): e1185.
- Hughes, R. A. (2002). "Peripheral neuropathy." *BMJ* **324**(7335): 466-469.
- Hung, C. H., S. H. Chan, P. M. Chu and K. L. Tsai (2015). "Docetaxel Facilitates Endothelial Dysfunction through Oxidative Stress via Modulation of Protein Kinase C Beta: The Protective Effects of Sotrastaurin." *Toxicol Sci* **145**(1): 59-67.
- Inagaki, M., E. Yoshikawa, Y. Matsuoka, Y. Sugawara, T. Nakano, T. Akechi, N. Wada, S. Imoto, K. Murakami and Y. Uchitomi (2007). "Smaller regional volumes of brain gray and white matter demonstrated in breast cancer survivors exposed to adjuvant chemotherapy." *Cancer* **109**(1): 146-156.
- Irwin, R. W., C. M. Solinsky, C. M. Loya, F. G. Salituro, K. E. Rodgers, G. Bauer, M. A. Rogawski and R. D. Brinton (2015). "Allopregnanolone preclinical acute pharmacokinetic and pharmacodynamic studies to predict tolerability and efficacy for Alzheimer's disease." *PLoS One* **10**(6): e0128313.
- Ito, S., K. Tajima, M. Nogawa, N. Inoue, T. Kyo, Y. Takahashi, T. Sasagawa, A. Nakamura, T. Kotera, M. Ueda, Y. Yamashita and K. Banno (2012). "Etodolac, a cyclooxygenase-2 inhibitor, attenuates paclitaxel-induced peripheral neuropathy in a mouse model of mechanical allodynia." *J Pharmacol Exp Ther* **342**(1): 53-60.
- Iyengar, S., A. A. Webster, S. K. Hemrick-Luecke, J. Y. Xu and R. M. Simmons (2004). "Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats." *J Pharmacol Exp Ther* **311**(2): 576-584.
- Ja'afar, F. M., F. B. Hamdan and F. H. Mohammed (2006). "Vincristine-induced neuropathy in rat: electrophysiological and histological study." *Exp Brain Res* **173**(2): 334-345.
- Jamieson, S. M., J. J. Liu, B. Connor, M. Dragunow and M. J. McKeage (2007). "Nucleolar enlargement, nuclear eccentricity and altered cell body immunostaining characteristics of large-sized sensory neurons following treatment of rats with paclitaxel." *Neurotoxicology* **28**(6): 1092-1098.
- Janes, K., C. Wahlman, J. W. Little, T. Doyle, D. K. Tosh, K. A. Jacobson and D. Salvemini (2015). "Spinal neuroimmune activation is independent of T-cell infiltration and attenuated by A3 adenosine

- receptor agonists in a model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy." *Brain Behav Immun* **44**: 91-99.
- Jansen, C. E., C. Miaskowski, M. Dodd, G. Dowling and J. Kramer (2005). "A metaanalysis of studies of the effects of cancer chemotherapy on various domains of cognitive function." *Cancer* **104**(10): 2222-2233.
- Janzer, R. C. and M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." *Nature* **325**(6101): 253-257.
- Jean-Pierre, P., G. R. Morrow, J. A. Roscoe, C. Heckler, S. Mohile, M. Janelins, L. Peppone, A. Hemstad, B. T. Esparaz and J. O. Hopkins (2010). "A phase 3 randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial of the effect of modafinil on cancer-related fatigue among 631 patients receiving chemotherapy: a University of Rochester Cancer Center Community Clinical Oncology Program Research base study." *Cancer* **116**(14): 3513-3520.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." *Nat Rev Neurosci* **6**(9): 671-682.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (2016). "The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves." *J Physiol* **594**(13): 3521-3531.
- Ji, R. R., T. Berta and M. Nedergaard (2013). "Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?" *Pain* **154 Suppl 1**: S10-28.
- Jiang, Y., C. Guo, M. R. Vasko and M. R. Kelley (2008). "Implications of apurinic/apyrimidinic endonuclease in reactive oxygen signaling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons." *Cancer Res* **68**(15): 6425-6434.
- Jim, H., G. Rodin and T. A. Ahles (2012). "Long-term effects of chemo on the cognitive function of cancer patients." *Oncology (Williston Park)* **26**(11): 1012, 1014, 1042.
- Jim, H. S., K. M. Phillips, S. Chait, L. A. Faul, M. A. Popa, Y. H. Lee, M. G. Hussin, P. B. Jacobsen and B. J. Small (2012). "Meta-analysis of cognitive functioning in breast cancer survivors previously treated with standard-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* **30**(29): 3578-3587.
- Jimenez-Andrade, J. M., C. M. Peters, N. A. Mejia, J. R. Ghilardi, M. A. Kuskowski and P. W. Mantyh (2006). "Sensory neurons and their supporting cells located in the trigeminal, thoracic and lumbar ganglia differentially express markers of injury following intravenous administration of paclitaxel in the rat." *Neurosci Lett* **405**(1-2): 62-67.
- Jin, X. and R. W. t. Gereau (2006). "Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha." *J Neurosci* **26**(1): 246-255.
- Johnson, C., V. S. Pankratz, A. I. Velazquez, J. A. Aakre, C. L. Loprinzi, N. P. Staff, A. J. Windebank and P. Yang (2015). "Candidate pathway-based genetic association study of platinum and platinum-taxane related toxicity in a cohort of primary lung cancer patients." *J Neurol Sci* **349**(1-2): 124-128.
- Joly, F., M. Lange, O. Rigal, H. Correia, B. Giffard, J. L. Beaumont, S. Clisant and L. Wagner (2012). "French version of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Cognitive Function (FACT-Cog) version 3." *Support Care Cancer* **20**(12): 3297-3305.
- Joseph, E. K. and J. D. Levine (2004). "Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat." *Eur J Neurosci* **20**(11): 2896-2902.
- Kahana, M. J., R. Sekuler, J. B. Caplan, M. Kirschen and J. R. Madsen (1999). "Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation." *Nature* **399**(6738): 781-784.
- Kanbayashi, Y., M. Inagaki, H. Ueno and T. Hosokawa (2017). "Predictors of the usefulness of duloxetine for chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Med Oncol* **34**(8): 137.
- Kanda, T. (2013). "Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **84**(2): 208-212.
- Karout, M., M. Miesch, P. Geoffroy, S. Kraft, H. D. Hofmann, A. G. Mensah-Nyagan and M. Kirsch (2016). "Novel analogs of allopregnanolone show improved efficiency and specificity in neuroprotection and stimulation of proliferation." *J Neurochem* **139**(5): 782-794.
- Karpa, K. D., J. E. Cavanaugh and J. M. Lakoski (2002). "Duloxetine pharmacology: profile of a dual monoamine modulator." *CNS Drug Rev* **8**(4): 361-376.

- Kasamo, K., P. Blier and C. De Montigny (1996). "Blockade of the serotonin and norepinephrine uptake processes by duloxetine: in vitro and in vivo studies in the rat brain." *J Pharmacol Exp Ther* **277**(1): 278-286.
- Kaufmann, M., G. N. Hortobagyi, A. Goldhirsch, S. Scholl, A. Makris, P. Valagussa, J. U. Blohmer, W. Eiermann, R. Jackesz, W. Jonat, A. Lebeau, S. Loibl, W. Miller, S. Seeber, V. Semiglazov, R. Smith, R. Souchon, V. Stearns, M. Untch and G. von Minckwitz (2006). "Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update." *J Clin Oncol* **24**(12): 1940-1949.
- Kaufmann, M., G. von Minckwitz, R. Smith, V. Valero, L. Gianni, W. Eiermann, A. Howell, S. D. Costa, P. Beuzeboc, M. Untch, J. U. Blohmer, H. P. Sinn, R. Sittrek, R. Souchon, A. H. Tulusan, T. Volm and H. J. Senn (2003). "International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations." *J Clin Oncol* **21**(13): 2600-2608.
- Kautio, A. L., M. Haanpaa, T. Saarto and E. Kalso (2008). "Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms." *J Pain Symptom Manage* **35**(1): 31-39.
- Kawasaki-Yatsugi, S., Y. Nagakura, S. Ogino, T. Sekizawa, T. Kiso, M. Takahashi, G. Ishikawa, H. Ito and Y. Shimizu (2012). "Automated measurement of spontaneous pain-associated limb movement and drug efficacy evaluation in a rat model of neuropathic pain." *Eur J Pain* **16**(10): 1426-1436.
- Kaya, A. O., U. Coskun, S. Buyukberber, M. Benekli, E. Tekin, C. Cifter, B. Ozturk, R. Yildiz, E. Yaman, A. Uner and D. Yamac (2010). "Efficacy and toxicity of preoperative chemotherapy with docetaxel and epirubicin in locally advanced invasive breast cancer." *J BUON* **15**(2): 248-254.
- Kaya, M. and B. Ahishali (2011). "Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase." *Methods Mol Biol* **763**: 369-382.
- Keaney, J., D. M. Walsh, T. O'Malley, N. Hudson, D. E. Crosbie, T. Loftus, F. Sheehan, J. McDaid, M. M. Humphries, J. J. Callanan, F. M. Brett, M. A. Farrell, P. Humphries and M. Campbell (2015). "Autoregulated paracellular clearance of amyloid-beta across the blood-brain barrier." *Sci Adv* **1**(8): e1500472.
- Kee, N., S. Sivalingam, R. Boonstra and J. M. Wojtowicz (2002). "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis." *J Neurosci Methods* **115**(1): 97-105.
- Keefe, R. S., S. M. McClintock, R. M. Roth, P. M. Doraiswamy, S. Tiger and M. Madhoo (2014). "Cognitive effects of pharmacotherapy for major depressive disorder: a systematic review." *J Clin Psychiatry* **75**(8): 864-876.
- Kerckhove, N., A. Collin, S. Conde, C. Chaletex, D. Pezet and D. Balayssac (2017). "Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review." *Front Pharmacol* **8**: 86.
- Kesler, S., S. M. Hadi Hosseini, C. Heckler, M. Janelins, O. Palesh, K. Mustian and G. Morrow (2013). "Cognitive training for improving executive function in chemotherapy-treated breast cancer survivors." *Clin Breast Cancer* **13**(4): 299-306.
- Kesler, S., M. Janelins, D. Koovakkattu, O. Palesh, K. Mustian, G. Morrow and F. S. Dhabhar (2013). "Reduced hippocampal volume and verbal memory performance associated with interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in chemotherapy-treated breast cancer survivors." *Brain Behav Immun* **30 Suppl**: S109-116.
- Kesler, S. R., F. C. Bennett, M. L. Mahaffey and D. Spiegel (2009). "Regional brain activation during verbal declarative memory in metastatic breast cancer." *Clin Cancer Res* **15**(21): 6665-6673.
- Kidd, J. F., M. F. Pilkington, M. J. Schell, K. E. Fogarty, J. N. Skepper, C. W. Taylor and P. Thorn (2002). "Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore." *J Biol Chem* **277**(8): 6504-6510.
- Kiguchi, N., T. Maeda, Y. Kobayashi and S. Kishioka (2008). "Up-regulation of tumor necrosis factor-alpha in spinal cord contributes to vincristine-induced mechanical allodynia in mice." *Neurosci Lett* **445**(2): 140-143.
- Kim, J. H., P. M. Dougherty and S. Abdi (2015). "Basic science and clinical management of painful and non-painful chemotherapy-related neuropathy." *Gynecol Oncol* **136**(3): 453-459.

- Knott, A. B. and E. Bossy-Wetzel (2008). "Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration." *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 283-292.
- Knowland, D., A. Arac, K. J. Sekiguchi, M. Hsu, S. E. Lutz, J. Perrino, G. K. Steinberg, B. A. Barres, A. Nimmerjahn and D. Agalliu (2014). "Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke." *Neuron* **82**(3): 603-617.
- Kohli, S., S. G. Fisher, Y. Tra, M. J. Adams, M. E. Mapstone, K. A. Wesnes, J. A. Roscoe and G. R. Morrow (2009). "The effect of modafinil on cognitive function in breast cancer survivors." *Cancer* **115**(12): 2605-2616.
- Kroemer, G., L. Galluzzi and L. Zitvogel (2013). "Immunological effects of chemotherapy in spontaneous breast cancers." *Oncoimmunology* **2**(12): e27158.
- Kroigard, T., H. D. Schroder, C. Qvortrup, L. Eckhoff, P. Pfeiffer, D. Gaist and S. H. Sindrup (2014). "Characterization and diagnostic evaluation of chronic polyneuropathies induced by oxaliplatin and docetaxel comparing skin biopsy to quantitative sensory testing and nerve conduction studies." *Eur J Neurol* **21**(4): 623-629.
- Kruidering, M., B. Van de Water, E. de Heer, G. J. Mulder and J. F. Nagelkerke (1997). "Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain." *J Pharmacol Exp Ther* **280**(2): 638-649.
- Kurozawa, Y., T. Hosoda and Y. Nasu (2010). "Current perception threshold for assessment of the neurological components of hand-arm vibration syndrome: a review." *Yonago Acta Med* **53**(3): 59-64.
- Lacomis, D. (2002). "Small-fiber neuropathy." *Muscle Nerve* **26**(2): 173-188.
- Lacourt, T. E. and C. J. Heijnen (2017). "Mechanisms of Neurotoxic Symptoms as a Result of Breast Cancer and Its Treatment: Considerations on the Contribution of Stress, Inflammation, and Cellular Bioenergetics." *Curr Breast Cancer Rep* **9**(2): 70-81.
- Lantz, R. J., T. A. Gillespie, T. J. Rash, F. Kuo, M. Skinner, H. Y. Kuan and M. P. Knadler (2003). "Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects." *Drug Metab Dispos* **31**(9): 1142-1150.
- Laursen, W. J., S. N. Bagriantsev and E. O. Gracheva (2014). "TRPA1 channels: chemical and temperature sensitivity." *Curr Top Membr* **74**: 89-112.
- Le Bars, D. and F. Adam (2002). "[Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]." *Ann Fr Anesth Reanim* **21**(4): 315-335.
- Ledeboer, A., B. M. Jekich, E. M. Sloane, J. H. Mahoney, S. J. Langer, E. D. Milligan, D. Martin, S. F. Maier, K. W. Johnson, L. A. Leinwand, R. A. Chavez and L. R. Watkins (2007). "Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats." *Brain Behav Immun* **21**(5): 686-698.
- Lee, K. M., D. Jung, H. Hwang, K. L. Son, T. Y. Kim, S. A. Im, K. H. Lee and B. J. Hahm (2018). "Pre-treatment anxiety is associated with persistent chemotherapy-induced peripheral neuropathy in women treated with neoadjuvant chemotherapy for breast cancer." *J Psychosom Res* **108**: 14-19.
- Lee, R. S., D. F. Hermens, M. A. Porter and M. A. Redoblado-Hodge (2012). "A meta-analysis of cognitive deficits in first-episode Major Depressive Disorder." *J Affect Disord* **140**(2): 113-124.
- Lee, T. K., J. H. Park, J. H. Ahn, M. C. Shin, J. H. Cho, E. J. Bae, Y. M. Kim, M. H. Won and C. H. Lee (2016). "Pretreated duloxetine protects hippocampal CA1 pyramidal neurons from ischemia-reperfusion injury through decreases of glial activation and oxidative stress." *J Neurol Sci* **370**: 229-236.
- Lees, J. G., P. G. Makker, R. S. Tonkin, M. Abdulla, S. B. Park, D. Goldstein and G. Moalem-Taylor (2017). "Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Eur J Cancer* **73**: 22-29.
- Lejri, I., A. Grimm, M. Miesch, P. Geoffroy, A. Eckert and A. G. Mensah-Nyagan (2017). "Allopregnanolone and its analog BR 297 rescue neuronal cells from oxidative stress-induced death through bioenergetic improvement." *Biochim Biophys Acta* **1863**(3): 631-642.
- Lemaire, V., S. Tronel, M. F. Montaron, A. Fabre, E. Dugast and D. N. Abrous (2012). "Long-lasting plasticity of hippocampal adult-born neurons." *J Neurosci* **32**(9): 3101-3108.

- Lepage, C., A. M. Smith, J. Moreau, E. Barlow-Krelina, N. Wallis, B. Collins, J. MacKenzie and C. Scherling (2014). "A prospective study of grey matter and cognitive function alterations in chemotherapy-treated breast cancer patients." *Springerplus* **3**: 444.
- Leung, L. and C. M. Cahill (2010). "TNF-alpha and neuropathic pain--a review." *J Neuroinflammation* **7**: 27.
- Ling, B., M. A. Coudore-Civiale, D. Balayssac, A. Eschalier, F. Coudore and N. Authier (2007). "Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat." *Toxicology* **234**(3): 176-184.
- Linnebank, M., H. Pels, N. Kleczar, S. Farmand, K. Fliessbach, H. Urbach, K. Orlopp, T. Klockgether, I. G. Schmidt-Wolf and U. Schlegel (2005). "MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism." *Neurology* **64**(5): 912-913.
- Liu, C., S. Luan, H. OuYang, Z. Huang, S. Wu, C. Ma, J. Wei and W. Xin (2016). "Upregulation of CCL2 via ATF3/c-Jun interaction mediated the Bortezomib-induced peripheral neuropathy." *Brain Behav Immun* **53**: 96-104.
- Liu, F. Y., Y. N. Sun, F. T. Wang, Q. Li, L. Su, Z. F. Zhao, X. L. Meng, H. Zhao, X. Wu, Q. Sun, G. G. Xing and Y. Wan (2012). "Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation." *Brain Res* **1427**: 65-77.
- Liu, X. J., Y. Zhang, T. Liu, Z. Z. Xu, C. K. Park, T. Berta, D. Jiang and R. R. Ji (2014). "Nociceptive neurons regulate innate and adaptive immunity and neuropathic pain through MyD88 adapter." *Cell Res* **24**(11): 1374-1377.
- Llorca-Torralba, M., G. Borges, F. Neto, J. A. Mico and E. Berrocoso (2016). "Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation." *Neuroscience* **338**: 93-113.
- Lombardi, D., S. Scalone, D. Crivellari, M. D. Magri, N. La Mura, G. Miolo, A. Murrone, T. Perin, F. Coran, E. Candiani, S. Massarut and A. Veronesi (2010). "Epirubicin and docetaxel as neoadjuvant treatment of locally advanced breast cancer: a phase II study." *Tumori* **96**(2): 229-233.
- Lopez Zunini, R. A., C. Scherling, N. Wallis, B. Collins, J. MacKenzie, C. Bielajew and A. M. Smith (2013). "Differences in verbal memory retrieval in breast cancer chemotherapy patients compared to healthy controls: a prospective fMRI study." *Brain Imaging Behav* **7**(4): 460-477.
- Lucassen, P. J., P. Meerlo, A. S. Naylor, A. M. van Dam, A. G. Dayer, E. Fuchs, C. A. Oomen and B. Czeh (2010). "Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action." *Eur Neuropsychopharmacol* **20**(1): 1-17.
- Lunn, M. P., R. A. Hughes and P. J. Wiffen (2009). "Duloxetine for treating painful neuropathy or chronic pain." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD007115.
- Lunn, M. P., R. A. Hughes and P. J. Wiffen (2014). "Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD007115.
- Lyons, L., M. ElBeltagy, J. Umka, R. Markwick, C. Startin, G. Bennett and P. Wigmore (2011). "Fluoxetine reverses the memory impairment and reduction in proliferation and survival of hippocampal cells caused by methotrexate chemotherapy." *Psychopharmacology (Berl)* **215**(1): 105-115.
- Mahableshwarkar, A. R., P. L. Jacobsen, Y. Chen, M. Serenko and M. H. Trivedi (2015). "A randomized, double-blind, duloxetine-referenced study comparing efficacy and tolerability of 2 fixed doses of vortioxetine in the acute treatment of adults with MDD." *Psychopharmacology (Berl)* **232**(12): 2061-2070.
- Majithia, N., S. M. Temkin, K. J. Ruddy, A. S. Beutler, D. L. Hershman and C. L. Loprinzi (2016). "National Cancer Institute-supported chemotherapy-induced peripheral neuropathy trials: outcomes and lessons." *Support Care Cancer* **24**(3): 1439-1447.
- Makker, P. G., S. S. Duffy, J. G. Lees, C. J. Perera, R. S. Tonkin, O. Butovsky, S. B. Park, D. Goldstein and G. Moalem-Taylor (2017). "Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy." *PLoS One* **12**(1): e0170814.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler and R. S. Duman (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* **20**(24): 9104-9110.

- Mar Fan, H. G., M. Clemons, W. Xu, I. Chemerynsky, H. Breunis, S. Braganza and I. F. Tannock (2008). "A randomised, placebo-controlled, double-blind trial of the effects of d-methylphenidate on fatigue and cognitive dysfunction in women undergoing adjuvant chemotherapy for breast cancer." *Support Care Cancer* **16**(6): 577-583.
- Marazziti, D., G. Consoli, M. Picchetti, M. Carlini and L. Faravelli (2010). "Cognitive impairment in major depression." *Eur J Pharmacol* **626**(1): 83-86.
- Marlatt, M. W., P. J. Lucassen and H. van Praag (2010). "Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice." *Brain Res* **1341**: 93-99.
- Marmiroli, P., B. Riva, E. Pozzi, E. Ballarini, D. Lim, A. Chiorazzi, C. Meregalli, C. Distasi, C. L. Renn, S. Semperboni, L. Morosi, F. A. Ruffinatti, M. Zucchetti, S. G. Dorsey, G. Cavaletti, A. Genazzani and V. A. Carozzi (2017). "Susceptibility of different mouse strains to oxaliplatin peripheral neurotoxicity: Phenotypic and genotypic insights." *PLoS One* **12**(10): e0186250.
- Masood, S. (2016). "Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers." *Womens Health (Lond)* **12**(5): 480-491.
- Massey, R. L., H. K. Kim and S. Abdi (2014). "Brief review: chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy (CIPPN): current status and future directions." *Can J Anaesth* **61**(8): 754-762.
- Materazzi, S., C. Fusi, S. Benemei, P. Pedretti, R. Patacchini, B. Nilius, J. Prenen, C. Creminon, P. Geppetti and R. Nassini (2012). "TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism." *Pflugers Arch* **463**(4): 561-569.
- Matsos, A., M. Loomes, I. Zhou, E. Macmillan, I. Sabel, E. Rotziokos, W. Beckwith and I. N. Johnston (2017). "Chemotherapy-induced cognitive impairments: White matter pathologies." *Cancer Treat Rev* **61**: 6-14.
- McDonald, B. C., S. K. Conroy, T. A. Ahles, J. D. West and A. J. Saykin (2010). "Gray matter reduction associated with systemic chemotherapy for breast cancer: a prospective MRI study." *Breast Cancer Res Treat* **123**(3): 819-828.
- McLean, A. C., N. Valenzuela, S. Fai and S. A. Bennett (2012). "Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification." *J Vis Exp*(67): e4389.
- McNeil, C. (2012). "Treating chemobrain: rehabilitation therapies emerge." *J Natl Cancer Inst* **104**(22): 1691-1692.
- McWhinney, S. R., R. M. Goldberg and H. L. McLeod (2009). "Platinum neurotoxicity pharmacogenetics." *Mol Cancer Ther* **8**(1): 10-16.
- Mehnert, A., A. Scherwath, L. Schirmer, B. Schleimer, C. Petersen, F. Schulz-Kindermann, A. R. Zander and U. Koch (2007). "The association between neuropsychological impairment, self-perceived cognitive deficits, fatigue and health related quality of life in breast cancer survivors following standard adjuvant versus high-dose chemotherapy." *Patient Educ Couns* **66**(1): 108-118.
- Melcangi, R. C. and G. C. Panzica (2014). "Allopregnanolone: state of the art." *Prog Neurobiol* **113**: 1-5.
- Melli, G., M. Taiana, F. Camozzi, D. Triolo, P. Podini, A. Quattrini, F. Taroni and G. Lauria (2008). "Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy." *Exp Neurol* **214**(2): 276-284.
- Meyer, L., C. Patte-Mensah, O. Taleb and A. G. Mensah-Nyagan (2010). "Cellular and functional evidence for a protective action of neurosteroids against vincristine chemotherapy-induced painful neuropathy." *Cell Mol Life Sci* **67**(17): 3017-3034.
- Meyer, L., C. Patte-Mensah, O. Taleb and A. G. Mensah-Nyagan (2011). "Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: multi-parametric assessment and direct evidence." *Pain* **152**(1): 170-181.
- Meyer, L., C. Patte-Mensah, O. Taleb and A. G. Mensah-Nyagan (2013). "Neurosteroid 3alpha-androstanediol efficiently counteracts paclitaxel-induced peripheral neuropathy and painful symptoms." *PLoS One* **8**(11): e80915.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* **114**(2): 181-190.

- Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." *Prog Neurobiol* **66**(6): 355-474.
- Milligan, E. D. and L. R. Watkins (2009). "Pathological and protective roles of glia in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* **10**(1): 23-36.
- Mimura, Y., H. Kato, K. Eguchi and T. Ogawa (2000). "Schedule dependency of paclitaxel-induced neuropathy in mice: a morphological study." *Neurotoxicology* **21**(4): 513-520.
- Mixcoatl-Zecuatl, T. and C. G. Jolivald (2011). "A spinal mechanism of action for duloxetine in a rat model of painful diabetic neuropathy." *Br J Pharmacol* **164**(1): 159-169.
- Miyake, A., M. J. Emerson and N. P. Friedman (2000). "Assessment of executive functions in clinical settings: problems and recommendations." *Semin Speech Lang* **21**(2): 169-183.
- Mo, M., I. Erdelyi, K. Szigeti-Buck, J. H. Benbow and B. E. Ehrlich (2012). "Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment." *FASEB J* **26**(11): 4696-4709.
- Moalem, G. and D. J. Tracey (2006). "Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain." *Brain Res Rev* **51**(2): 240-264.
- Monje, M. (2018). "Myelin Plasticity and Nervous System Function." *Annu Rev Neurosci* **41**: 61-76.
- Monje, M. and J. Dietrich (2012). "Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis." *Behav Brain Res* **227**(2): 376-379.
- Morris, P. G. and C. A. Hudis (2010). "Optimizing dose-dense regimens for early-stage breast cancer." *Nat Rev Clin Oncol* **7**(12): 678-679.
- Morris, R. L. and P. J. Hollenbeck (1995). "Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons." *J Cell Biol* **131**(5): 1315-1326.
- Myers, J. S. (2009). "Chemotherapy-related cognitive impairment." *Clin J Oncol Nurs* **13**(4): 413-421.
- Nagy, I., D. Friston, J. S. Valente, J. V. Torres Perez and A. P. Andreou (2014). "Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel." *Prog Drug Res* **68**: 39-76.
- Namgung, U. (2014). "The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration." *Cells Tissues Organs* **200**(1): 6-12.
- Napolitano, E., E. P. Elovic and A. I. Qureshi (2005). "Pharmacological stimulant treatment of neurocognitive and functional deficits after traumatic and non-traumatic brain injury." *Med Sci Monit* **11**(6): RA212-220.
- Nassini, R., M. Gees, S. Harrison, G. De Siena, S. Materazzi, N. Moretto, P. Failli, D. Preti, N. Marchetti, A. Cavazzini, F. Mancini, P. Pedretti, B. Nilius, R. Patacchini and P. Geppetti (2011). "Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation." *Pain* **152**(7): 1621-1631.
- Nee, D. E. and M. D'Esposito (2017). "Causal evidence for lateral prefrontal cortex dynamics supporting cognitive control." *Elife* **6**.
- Nezhadi, A., V. Sheibani, K. Esmaeilpour, M. Shabani and S. Esmaeili-Mahani (2016). "Neurosteroid allopregnanolone attenuates cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease." *Behav Brain Res* **305**: 258-264.
- Niendam, T. A., A. R. Laird, K. L. Ray, Y. M. Dean, D. C. Glahn and C. S. Carter (2012). "Meta-analytic evidence for a superordinate cognitive control network subserving diverse executive functions." *Cogn Affect Behav Neurosci* **12**(2): 241-268.
- Nieto, F. R., J. M. Entrena, C. M. Cendan, E. D. Pozo, J. M. Vela and J. M. Baeyens (2008). "Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice." *Pain* **137**(3): 520-531.
- Nokia, M. S., M. L. Anderson and T. J. Shors (2012). "Chemotherapy disrupts learning, neurogenesis and theta activity in the adult brain." *Eur J Neurosci* **36**(11): 3521-3530.
- Noorbakhsh, F., G. B. Baker and C. Power (2014). "Allopregnanolone and neuroinflammation: a focus on multiple sclerosis." *Front Cell Neurosci* **8**: 134.
- Noorbakhsh, F., K. K. Ellestad, F. Maingat, K. G. Warren, M. H. Han, L. Steinman, G. B. Baker and C. Power (2011). "Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis." *Brain* **134**(Pt 9): 2703-2721.
- Nowikovsky, K., R. J. Schweyen and P. Bernardi (2009). "Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition." *Biochim Biophys Acta* **1787**(5): 345-350.

- O'Keefe, J. (1999). "Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information?" Hippocampus **9**(4): 352-364.
- O'Keefe, E. and M. Campbell (2016). "Modulating the paracellular pathway at the blood-brain barrier: current and future approaches for drug delivery to the CNS." Drug Discov Today Technol **20**: 35-39.
- Obata, H., S. Saito, M. Sasaki, K. Ishizaki and F. Goto (2001). "Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT(2) agonists in rats with nerve ligation." Pain **90**(1-2): 173-179.
- Obata, K., H. Katsura, T. Mizushima, H. Yamanaka, K. Kobayashi, Y. Dai, T. Fukuoka, A. Tokunaga, M. Tominaga and K. Noguchi (2005). "TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury." J Clin Invest **115**(9): 2393-2401.
- Obermeier, B., R. Daneman and R. M. Ransohoff (2013). "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier." Nat Med **19**(12): 1584-1596.
- Ohgi, Y., T. Futamura, T. Kikuchi and K. Hashimoto (2013). "Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration." Pharmacol Biochem Behav **103**(4): 853-859.
- Ohtomo, R., A. Iwata and K. Arai (2018). "Molecular Mechanisms of Oligodendrocyte Regeneration in White Matter-Related Diseases." Int J Mol Sci **19**(6).
- Old, E. A., S. Nadkarni, J. Grist, C. Gentry, S. Bevan, K. W. Kim, A. J. Mogg, M. Perretti and M. Malcangio (2014). "Monocytes expressing CX3CR1 orchestrate the development of vincristine-induced pain." J Clin Invest **124**(5): 2023-2036.
- Olin, J. J. (2001). "Cognitive function after systemic therapy for breast cancer." Oncology (Williston Park) **15**(5): 613-618; discussion 618, 621-614.
- Onutu, A. H. (2015). "Duloxetine, an antidepressant with analgesic properties - a preliminary analysis." Rom J Anaesth Intensive Care **22**(2): 123-128.
- Orchard, T. S., M. M. Gaudier-Diaz, K. R. Weinhold and A. Courtney DeVries (2017). "Clearing the fog: a review of the effects of dietary omega-3 fatty acids and added sugars on chemotherapy-induced cognitive deficits." Breast Cancer Res Treat **161**(3): 391-398.
- Osburg, B., C. Peiser, D. Domling, L. Schomburg, Y. T. Ko, K. Voigt and U. Bickel (2002). "Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF-alpha at the blood-brain barrier of the rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(5): E899-908.
- Osterlund, T. and P. Kogerman (2006). "Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli." Trends Cell Biol **16**(4): 176-180.
- Oxman, T. E. and P. M. Silberfarb (1980). "Serial cognitive testing in cancer patients receiving chemotherapy." Am J Psychiatry **137**(10): 1263-1265.
- Pachman, D. R., J. C. Watson, M. B. Lustberg, N. D. Wagner-Johnston, A. Chan, L. Broadfield, Y. T. Cheung, C. Steer, D. J. Storey, K. D. Chandwani, J. Paice, P. Jean-Pierre, J. Oh, J. Kamath, M. Fallon, H. Strik, S. Koeppen and C. L. Loprinzi (2014). "Management options for established chemotherapy-induced peripheral neuropathy." Support Care Cancer **22**(8): 2281-2295.
- Pagani, O., C. Sessa, G. Martinelli, D. Crivellari, A. Buonadonna, B. Thurlimann, D. Hess, M. Borner, J. Bauer, G. Zampino, M. Zimatore, R. Graffeo, A. Riva and A. Goldhirsch (1999). "Dose-finding study of epidoxorubicin and docetaxel as first-line chemotherapy in patients with advanced breast cancer." Ann Oncol **10**(5): 539-545.
- Pai, M. C. and W. J. Jacobs (2004). "Topographical disorientation in community-residing patients with Alzheimer's disease." Int J Geriatr Psychiatry **19**(3): 250-255.
- Pajevic, S., P. J. Basser and R. D. Fields (2014). "Role of myelin plasticity in oscillations and synchrony of neuronal activity." Neuroscience **276**: 135-147.
- Pan, W., Y. Ding, Y. Yu, H. Ohtaki, T. Nakamachi and A. J. Kastin (2006). "Stroke upregulates TNFalpha transport across the blood-brain barrier." Exp Neurol **198**(1): 222-233.
- Pan, W., A. J. Kastin and J. M. Brennan (2000). "Saturable entry of leukemia inhibitory factor from blood to the central nervous system." J Neuroimmunol **106**(1-2): 172-180.
- Pan, W., A. J. Kastin, T. Rigai, R. McLay and C. G. Pick (2003). "Increased hippocampal uptake of tumor necrosis factor alpha and behavioral changes in mice." Exp Brain Res **149**(2): 195-199.

- Pan, W., K. P. Stone, H. Hsueh, V. K. Manda, Y. Zhang and A. J. Kastin (2011). "Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function." *Curr Pharm Des* **17**(33): 3729-3740.
- Pardridge, W. M. (2007). "Blood-brain barrier delivery." *Drug Discov Today* **12**(1-2): 54-61.
- Pardridge, W. M. (2007). "Brain drug development and brain drug targeting." *Pharm Res* **24**(9): 1729-1732.
- Park, J. A. and C. H. Lee (2018). "Neuroprotective Effect of Duloxetine on Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Hippocampal Neuronal Damage." *Biomol Ther (Seoul)* **26**(2): 115-120.
- Park, S. B., D. Goldstein, A. V. Krishnan, C. S. Lin, M. L. Friedlander, J. Cassidy, M. Koltzenburg and M. C. Kiernan (2013). "Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis." *CA Cancer J Clin* **63**(6): 419-437.
- Park, S. B., C. S. Lin, A. V. Krishnan, D. Goldstein, M. L. Friedlander and M. C. Kiernan (2011). "Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility." *Oncologist* **16**(5): 708-716.
- Patte-Mensah, C., C. Kibaly, D. Boudard, V. Schaeffer, A. Begle, S. Saredi, L. Meyer and A. G. Mensah-Nyagan (2006). "Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord." *J Mol Neurosci* **28**(1): 17-31.
- Patte-Mensah, C., L. Meyer, V. Schaeffer and A. G. Mensah-Nyagan (2010). "Selective regulation of 3 alpha-hydroxysteroid oxido-reductase expression in dorsal root ganglion neurons: a possible mechanism to cope with peripheral nerve injury-induced chronic pain." *Pain* **150**(3): 522-534.
- Patte-Mensah, C., L. Meyer, O. Taleb and A. G. Mensah-Nyagan (2014). "Potential role of allopregnanolone for a safe and effective therapy of neuropathic pain." *Prog Neurobiol* **113**: 70-78.
- Pehrson, A. L., S. C. Leiser, M. Gulinello, E. Dale, Y. Li, J. A. Waller and C. Sanchez (2015). "Treatment of cognitive dysfunction in major depressive disorder--a review of the preclinical evidence for efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors and the multimodal-acting antidepressant vortioxetine." *Eur J Pharmacol* **753**: 19-31.
- Peier, A. M., A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan and A. Patapoutian (2002). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." *Cell* **108**(5): 705-715.
- Peng, P., Q. Xi, S. Xia, L. Zhuang, Q. Gui, Y. Chen, Y. Huang, M. Zou, J. Rao and S. Yu (2012). "Pregabalin attenuates docetaxel-induced neuropathy in rats." *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **32**(4): 586-590.
- Penson, R. T., K. Kronish, Z. Duan, A. J. Feller, P. Stark, S. E. Cook, L. R. Duska, A. F. Fuller, A. K. Goodman, N. Nikrui, K. M. MacNeill, U. A. Matulonis, F. I. Preffer and M. V. Seiden (2000). "Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel." *Int J Gynecol Cancer* **10**(1): 33-41.
- Pereira, S., F. Fontes, T. Sonin, T. Dias, M. Fragoso, J. Castro-Lopes and N. Lunet (2014). "Neurological complications of breast cancer: study protocol of a prospective cohort study." *BMJ Open* **4**(10): e006301.
- Pereira, S., F. Fontes, T. Sonin, T. Dias, M. Fragoso, J. M. Castro-Lopes and N. Lunet (2015). "Neurological complications of breast cancer: A prospective cohort study." *Breast* **24**(5): 582-587.
- Pereira, S., F. Fontes, T. Sonin, T. Dias, M. Fragoso, J. M. Castro-Lopes and N. Lunet (2016). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy after neoadjuvant or adjuvant treatment of breast cancer: a prospective cohort study." *Support Care Cancer* **24**(4): 1571-1581.
- Periquet, M. I., V. Novak, M. P. Collins, H. N. Nagaraja, S. Erdem, S. M. Nash, M. L. Freimer, Z. Sahenk, J. T. Kissel and J. R. Mendell (1999). "Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy." *Neurology* **53**(8): 1641-1647.
- Persohn, E., A. Canta, S. Schoepfer, M. Traebert, L. Mueller, A. Gilardini, S. Galbiati, G. Nicolini, A. Scuteri, F. Lanzani, G. Giussani and G. Cavaletti (2005). "Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats." *Eur J Cancer* **41**(10): 1460-1466.
- Peters, C. M., J. M. Jimenez-Andrade, M. A. Kuskowski, J. R. Ghilardi and P. W. Mantyh (2007). "An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat." *Brain Res* **1168**: 46-59.

- Pevida, M., A. Lastra, A. Hidalgo, A. Baamonde and L. Menendez (2013). "Spinal CCL2 and microglial activation are involved in paclitaxel-evoked cold hyperalgesia." *Brain Res Bull* **95**: 21-27.
- Pidgeon, L. M. and A. M. Morcom (2016). "Cortical pattern separation and item-specific memory encoding." *Neuropsychologia* **85**: 256-271.
- Pitcher, G. M., J. Ritchie and J. L. Henry (1999). "Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands." *J Neurosci Methods* **87**(2): 185-193.
- Polomano, R. C., A. J. Mannes, U. S. Clark and G. J. Bennett (2001). "A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel." *Pain* **94**(3): 293-304.
- Porter, A., R. Leckie and T. Verstynen (2018). "White matter pathways as both a target and mediator of health behaviors." *Ann N Y Acad Sci*.
- Postma, T. J., B. A. Benard, P. C. Huijgens, G. J. Ossenkoppele and J. J. Heimans (1993). "Long-term effects of vincristine on the peripheral nervous system." *J Neurooncol* **15**(1): 23-27.
- Postma, T. J. and J. J. Heimans (2000). "Grading of chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Ann Oncol* **11**(5): 509-513.
- Pusztai, L., T. R. Mendoza, J. M. Reuben, M. M. Martinez, J. S. Willey, J. Lara, A. Syed, H. A. Fritsche, E. Bruera, D. Booser, V. Valero, B. Arun, N. Ibrahim, E. Rivera, M. Royce, C. S. Cleeland and G. N. Hortobagyi (2004). "Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy." *Cytokine* **25**(3): 94-102.
- Qian, X., H. Cao, Q. Ma, Q. Wang, W. He, P. Qin, B. Ji, K. Yuan, F. Yang, X. Liu, Q. Lian and J. Li (2015). "Allopregnanolone attenuates Abeta25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by reducing oxidative stress." *Int J Clin Exp Med* **8**(8): 13610-13615.
- Quartu, M., V. A. Carozzi, S. G. Dorsey, M. P. Serra, L. Poddighe, C. Picci, M. Boi, T. Melis, M. Del Fiacco, C. Meregalli, A. Chiorazzi, C. L. Renn, G. Cavaletti and P. Marmiroli (2014). "Bortezomib treatment produces nocifensive behavior and changes in the expression of TRPV1, CGRP, and substance P in the rat DRG, spinal cord, and sciatic nerve." *Biomed Res Int* **2014**: 180428.
- Quasthoff, S. and H. P. Hartung (2002). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *J Neurol* **249**(1): 9-17.
- Rao, R. D., P. J. Flynn, J. A. Sloan, G. Y. Wong, P. Novotny, D. B. Johnson, H. M. Gross, S. I. Renno, M. Nashawaty and C. L. Loprinzi (2008). "Efficacy of lamotrigine in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial, N01C3." *Cancer* **112**(12): 2802-2808.
- Rao, R. D., J. C. Michalak, J. A. Sloan, C. L. Loprinzi, G. S. Soori, D. A. Nikcevich, D. O. Warner, P. Novotny, L. A. Kutteh, G. Y. Wong and G. North Central Cancer Treatment (2007). "Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3)." *Cancer* **110**(9): 2110-2118.
- Reddick, W. E., Z. Y. Shan, J. O. Glass, S. Helton, X. Xiong, S. Wu, M. J. Bonner, S. C. Howard, R. Christensen, R. B. Khan, C. H. Pui and R. K. Mulhern (2006). "Smaller white-matter volumes are associated with larger deficits in attention and learning among long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia." *Cancer* **106**(4): 941-949.
- Reid-Arndt, S. A., C. Hsieh and M. C. Perry (2010). "Neuropsychological functioning and quality of life during the first year after completing chemotherapy for breast cancer." *Psychooncology* **19**(5): 535-544.
- Ren, X., D. K. St Clair and D. A. Butterfield (2017). "Dysregulation of cytokine mediated chemotherapy induced cognitive impairment." *Pharmacol Res* **117**: 267-273.
- Resta, F., L. Micheli, A. Laurino, V. Spinelli, T. Mello, L. Sartiani, L. Di Cesare Mannelli, E. Cerbai, C. Ghelardini, M. N. Romanelli, G. Mannaioni and A. Masi (2018). "Selective HCN1 block as a strategy to control oxaliplatin-induced neuropathy." *Neuropharmacology* **131**: 403-413.
- Reyes-Garcia, M. G., F. Hernandez-Hernandez, B. Hernandez-Tellez and F. Garcia-Tamayo (2007). "GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production." *J Neuroimmunol* **188**(1-2): 64-68.

- Reyes-Gibby, C. C., P. K. Morrow, A. Buzdar and S. Shete (2009). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy as a predictor of neuropathic pain in breast cancer patients previously treated with paclitaxel." *J Pain* **10**(11): 1146-1150.
- Ridger, V. C., S. A. Greenacre, R. L. Handy, B. Halliwell, P. K. Moore, M. Whiteman and S. D. Brain (1997). "Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat." *Br J Pharmacol* **122**(6): 1083-1088.
- Riedel, A., S. Braune, G. Kerum, J. Schulte-Monting and C. H. Lucking (1999). "Quantitative sudomotor axon reflex test (QSART): a new approach for testing distal sites." *Muscle Nerve* **22**(9): 1257-1264.
- Riediger, C., T. Schuster, K. Barlinn, S. Maier, J. Weitz and T. Siepmann (2017). "Adverse Effects of Antidepressants for Chronic Pain: A Systematic Review and Meta-analysis." *Front Neurol* **8**: 307.
- Rivers, L. E., K. M. Young, M. Rizzi, F. Jamen, K. Psachoulia, A. Wade, N. Kessaris and W. D. Richardson (2008). "PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice." *Nat Neurosci* **11**(12): 1392-1401.
- Ro, J. Y., J. S. Lee and Y. Zhang (2009). "Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia." *Pain* **144**(3): 270-277.
- Robins, S. and M. Kokoeva (2018). "Ng2-Glia, a New Player in Energy Balance." *Neuroendocrinology*.
- Robins, S. C., E. Trudel, O. Rotondi, X. Liu, T. Djogo, D. Kryzskaya, C. W. Bourque and M. V. Kokoeva (2013). "Evidence for NG2-glia derived, adult-born functional neurons in the hypothalamus." *PLoS One* **8**(10): e78236.
- Robinson, C. R. and P. M. Dougherty (2015). "Spinal astrocyte gap junction and glutamate transporter expression contributes to a rat model of bortezomib-induced peripheral neuropathy." *Neuroscience* **285**: 1-10.
- Roglio, I., R. Bianchi, F. Camozzi, V. Carozzi, I. Cervellini, D. Crippa, G. Lauria, G. Cavaletti and R. C. Melcangi (2009). "Docetaxel-induced peripheral neuropathy: protective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model." *J Peripher Nerv Syst* **14**(1): 36-44.
- Rosenblat, J. D., R. Kakar and R. S. McIntyre (2015). "The Cognitive Effects of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials." *Int J Neuropsychopharmacol* **19**(2).
- Rossetti, M. F., M. J. Cambiasso, M. A. Holschbach and R. Cabrera (2016). "Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain." *J Neuroendocrinol* **28**(7).
- Rubin, L. L. (1991). "The blood-brain barrier in and out of cell culture." *Curr Opin Neurobiol* **1**(3): 360-363.
- Rueter, L. E., C. De Montigny and P. Blier (1998). "Electrophysiological characterization of the effect of long-term duloxetine administration on the rat serotonergic and noradrenergic systems." *J Pharmacol Exp Ther* **285**(2): 404-412.
- Rueter, L. E., K. Kasamo, C. de Montigny and P. Blier (1998). "Effect of long-term administration of duloxetine on the function of serotonin and noradrenaline terminals in the rat brain." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **357**(6): 600-610.
- Ruiz-Medina, J., A. Baulies, S. A. Bura and O. Valverde (2013). "Paclitaxel-induced neuropathic pain is age dependent and devolves on glial response." *Eur J Pain* **17**(1): 75-85.
- Saad, M., C. Tafani, D. Psimaras and D. Ricard (2014). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in the adult." *Curr Opin Oncol* **26**(6): 634-641.
- Sakamoto, A., T. Andoh and Y. Kuraishi (2016). "Involvement of mast cells and proteinase-activated receptor 2 in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in mice." *Pharmacol Res* **105**: 84-92.
- Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." *Physiol Rev* **89**(2): 707-758.
- Saria, A. and J. M. Lundberg (1983). "Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues." *J Neurosci Methods* **8**(1): 41-49.
- Sasaki, M., K. Ishizaki, H. Obata and F. Goto (2001). "Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test." *Eur J Pharmacol* **424**(1): 45-52.

- Schagen, S. B., F. S. van Dam, M. J. Muller, W. Boogerd, J. Lindeboom and P. F. Bruning (1999). "Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma." *Cancer* **85**(3): 640-650.
- Schagen, S. B. and J. S. Wefel (2013). "Chemotherapy-related changes in cognitive functioning." *EJC Suppl* **11**(2): 225-232.
- Schinazi, R. F., F. D. Boudinot, S. S. Ibrahim, C. Manning, H. M. McClure and D. C. Liotta (1992). "Pharmacokinetics and metabolism of racemic 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine in rhesus monkeys." *Antimicrob Agents Chemother* **36**(11): 2432-2438.
- Schinkel, A. H. (1999). "P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier." *Adv Drug Deliv Rev* **36**(2-3): 179-194.
- Schlegel, A. A., J. J. Rudelson and P. U. Tse (2012). "White matter structure changes as adults learn a second language." *J Cogn Neurosci* **24**(8): 1664-1670.
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322.
- Schonherr, A., V. Aivazova-Fuchs, K. Annecke, J. Juckstock, P. Hepp, U. Andergassen, D. Augustin, W. Simon, A. Wischnik, S. Mohrmann, J. Salmen, T. Zwingers, M. Kiechle, N. Harbeck, K. Friese, W. Janni and B. Rack (2012). "Toxicity Analysis in the ADEBAR Trial: Sequential Anthracycline-Taxane Therapy Compared with FEC120 for the Adjuvant Treatment of High-Risk Breast Cancer." *Breast Care (Basel)* **7**(4): 289-295.
- Schule, C., C. Nothdurfter and R. Rupprecht (2014). "The role of allopregnanolone in depression and anxiety." *Prog Neurobiol* **113**: 79-87.
- Scuteri, A., A. Galimberti, D. Maggioni, M. Ravasi, S. Pasini, G. Nicolini, M. Bossi, M. Miloso, G. Cavaletti and G. Tredici (2009). "Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis." *Neurotoxicology* **30**(2): 312-319.
- Seigers, R., M. Loos, O. Van Tellingen, W. Boogerd, A. B. Smit and S. B. Schagen (2015). "Cognitive impact of cytotoxic agents in mice." *Psychopharmacology (Berl)* **232**(1): 17-37.
- Seigers, R., M. Loos, O. Van Tellingen, W. Boogerd, A. B. Smit and S. B. Schagen (2016). "Neurobiological changes by cytotoxic agents in mice." *Behav Brain Res* **299**: 19-26.
- Seigers, R., S. B. Schagen, W. Beerling, W. Boogerd, O. van Tellingen, F. S. van Dam, J. M. Koolhaas and B. Buwalda (2008). "Long-lasting suppression of hippocampal cell proliferation and impaired cognitive performance by methotrexate in the rat." *Behav Brain Res* **186**(2): 168-175.
- Seigers, R., S. B. Schagen, O. Van Tellingen and J. Dietrich (2013). "Chemotherapy-related cognitive dysfunction: current animal studies and future directions." *Brain Imaging Behav* **7**(4): 453-459.
- Seretny, M., G. L. Currie, E. S. Sena, S. Ramnarine, R. Grant, M. R. MacLeod, L. A. Colvin and M. Fallon (2014). "Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis." *Pain* **155**(12): 2461-2470.
- Shao, N., S. Wang, C. Yao, X. Xu, Y. Zhang, Y. Zhang and Y. Lin (2012). "Sequential versus concurrent anthracyclines and taxanes as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of phase III randomized control trials." *Breast* **21**(3): 389-393.
- Shemesh, O. A. and M. E. Spira (2010). "Paclitaxel induces axonal microtubules polar reconfiguration and impaired organelle transport: implications for the pathogenesis of paclitaxel-induced polyneuropathy." *Acta Neuropathol* **119**(2): 235-248.
- Shprung, T. and I. Gozes (2009). "A novel method for analyzing mitochondrial movement: inhibition by paclitaxel in a pheochromocytoma cell model." *J Mol Neurosci* **37**(3): 254-262.
- Silberfarb, P. M. (1983). "Chemotherapy and cognitive defects in cancer patients." *Annu Rev Med* **34**: 35-46.
- Silberfarb, P. M., D. Philibert and P. M. Levine (1980). "Psychosocial aspects of neoplastic disease: II. Affective and cognitive effects of chemotherapy in cancer patients." *Am J Psychiatry* **137**(5): 597-601.
- Simone, D. A., T. K. Baumann and R. H. LaMotte (1989). "Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin." *Pain* **38**(1): 99-107.

- Singh, C., L. Liu, J. M. Wang, R. W. Irwin, J. Yao, S. Chen, S. Henry, R. F. Thompson and R. D. Brinton (2012). "Allopregnanolone restores hippocampal-dependent learning and memory and neural progenitor survival in aging 3xTgAD and nonTg mice." *Neurobiol Aging* **33**(8): 1493-1506.
- Skljarevski, V., D. Desai, Q. Zhang, A. S. Chappell, M. J. Detke, J. L. Gross and D. Ziegler (2009). "Evaluating the maintenance of effect of duloxetine in patients with diabetic peripheral neuropathic pain." *Diabetes Metab Res Rev* **25**(7): 623-631.
- Skljarevski, V., E. P. Frakes, D. Sagman, S. Lipsius, A. N. Heinloth and H. J. Duenas Tentori (2012). "Review of Efficacy and Safety of Duloxetine 40 to 60 mg Once Daily in Patients with Diabetic Peripheral Neuropathic Pain." *Pain Res Treat* **2012**: 898347.
- Skljarevski, V., S. Zhang, D. Desai, K. J. Alaka, S. Palacios, T. Miazgowski and K. Patrick (2010). "Duloxetine versus placebo in patients with chronic low back pain: a 12-week, fixed-dose, randomized, double-blind trial." *J Pain* **11**(12): 1282-1290.
- Smith, E. M., S. L. Beck and J. Cohen (2008). "The total neuropathy score: a tool for measuring chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Oncol Nurs Forum* **35**(1): 96-102.
- Smith, E. M., H. Pang, C. Cirrincione, S. Fleishman, E. D. Paskett, T. Ahles, L. R. Bressler, C. E. Fadul, C. Knox, N. Le-Lindqwister, P. B. Gilman, C. L. Shapiro and O. Alliance for Clinical Trials in (2013). "Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial." *JAMA* **309**(13): 1359-1367.
- Smith, S. B., S. E. Crager and J. S. Mogil (2004). "Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains." *Life Sci* **74**(21): 2593-2604.
- Spanheimer, P. M., J. C. Carr, A. Thomas, S. L. Sugg, C. E. Scott-Conner, J. Liao and R. J. Weigel (2013). "The response to neoadjuvant chemotherapy predicts clinical outcome and increases breast conservation in advanced breast cancer." *Am J Surg* **206**(1): 2-7.
- Sparkman, N. L., J. B. Buchanan, J. R. Heyen, J. Chen, J. L. Beverly and R. W. Johnson (2006). "Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers." *J Neurosci* **26**(42): 10709-10716.
- Staff, N. P., A. Grisold, W. Grisold and A. J. Windebank (2017). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review." *Ann Neurol* **81**(6): 772-781.
- Stahl, S. M., M. M. Grady, C. Moret and M. Briley (2005). "SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants." *CNS Spectr* **10**(9): 732-747.
- Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2002). "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress." *J Cell Biol* **156**(6): 1051-1063.
- Stark, S. M., M. A. Yassa, J. W. Lacy and C. E. Stark (2013). "A task to assess behavioral pattern separation (BPS) in humans: Data from healthy aging and mild cognitive impairment." *Neuropsychologia* **51**(12): 2442-2449.
- Starkweather, A. (2010). "Increased interleukin-6 activity associated with painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy in women after breast cancer treatment." *Nurs Res Pract* **2010**: 281531.
- Starobova, H. and I. Vetter (2017). "Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy." *Front Mol Neurosci* **10**: 174.
- Stewart, D. J. (1994). "A critique of the role of the blood-brain barrier in the chemotherapy of human brain tumors." *J Neurooncol* **20**(2): 121-139.
- Stoeber, K., T. D. Tlsty, L. Happerfield, G. A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E. D. Williams and G. H. Williams (2001). "DNA replication licensing and human cell proliferation." *J Cell Sci* **114**(Pt 11): 2027-2041.
- Story, G. M. (2006). "The emerging role of TRP channels in mechanisms of temperature and pain sensation." *Curr Neuropharmacol* **4**(3): 183-196.
- Sun, C., X. Ou, J. M. Farley, C. Stockmeier, S. Bigler, R. D. Brinton and J. M. Wang (2012). "Allopregnanolone increases the number of dopaminergic neurons in substantia nigra of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* **9**(4): 473-480.

- Sun, Y. H., H. S. Li, C. Zhu, W. Hu, J. Yang, G. L. Zhao, G. J. Lu, S. X. Wu and Y. L. Dong (2014). "The analgesia effect of duloxetine on post-operative pain via intrathecal or intraperitoneal administration." *Neurosci Lett* **568**: 6-11.
- Ta, L. E., A. J. Bieber, S. M. Carlton, C. L. Loprinzi, P. A. Low and A. J. Windebank (2010). "Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice." *Mol Pain* **6**: 15.
- Ta, L. E., L. Espeset, J. Podratz and A. J. Windebank (2006). "Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding." *Neurotoxicology* **27**(6): 992-1002.
- Taleb, O., F. Bouzobra, H. Tekin-Pala, L. Meyer, A. G. Mensah-Nyagan and C. Patte-Mensah (2017). "Behavioral and electromyographic assessment of oxaliplatin-induced motor dysfunctions: Evidence for a therapeutic effect of allopregnanolone." *Behav Brain Res* **320**: 440-449.
- Taleb, O., C. Patte-Mensah, L. Meyer, V. Kemmel, P. Geoffroy, M. Miesch and A. G. Mensah-Nyagan (2018). "Evidence for effective structure-based neuromodulatory effects of new analogues of neurosteroid allopregnanolone." *J Neuroendocrinol* **30**(2).
- Tangpong, J., M. P. Cole, R. Sultana, G. Joshi, S. Estus, M. Vore, W. St Clair, S. Ratanachaiyavong, D. K. St Clair and D. A. Butterfield (2006). "Adriamycin-induced, TNF-alpha-mediated central nervous system toxicity." *Neurobiol Dis* **23**(1): 127-139.
- Tchen, N., H. G. Juffs, F. P. Downie, Q. L. Yi, H. Hu, I. Chemerynsky, M. Clemons, M. Crump, P. E. Goss, D. Warr, M. E. Tweedale and I. F. Tannock (2003). "Cognitive function, fatigue, and menopausal symptoms in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer." *J Clin Oncol* **21**(22): 4175-4183.
- ten Tije, A. J., W. J. Loos, M. Zhao, S. D. Baker, R. H. Enting, H. van der Meulen, J. Verweij and A. Sparreboom (2004). "Limited cerebrospinal fluid penetration of docetaxel." *Anticancer Drugs* **15**(7): 715-718.
- Thaisetthawatkul, P., J. A. Fernandes Filho and D. N. Herrmann (2013). "Contribution of QSART to the diagnosis of small fiber neuropathy." *Muscle Nerve* **48**(6): 883-888.
- Theodorakis, P. E., E. A. Muller, R. V. Craster and O. K. Matar (2017). "Physical insights into the blood-brain barrier translocation mechanisms." *Phys Biol* **14**(4): 041001.
- Therasse, P., L. Mauriac, M. Welnicka-Jaskiewicz, P. Bruning, T. Cufer, H. Bonnefoi, E. Tomiak, K. I. Pritchard, A. Hamilton, M. J. Piccart and EORTC (2003). "Final results of a randomized phase III trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with a dose-intensified epirubicin and cyclophosphamide + filgrastim as neoadjuvant treatment in locally advanced breast cancer: an EORTC-NCIC-SAKK multicenter study." *J Clin Oncol* **21**(5): 843-850.
- Thibault, K., J. Van Steenwinkel, M. J. Brisorgueil, J. Fischer, M. Hamon, B. Calvino and M. Conrath (2008). "Serotonin 5-HT_{2A} receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat." *Pain* **140**(2): 305-322.
- Thompson, R. J., J. F. Doran, P. Jackson, A. P. Dhillon and J. Rode (1983). "PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells." *Brain Res* **278**(1-2): 224-228.
- Thorburn, A. (2004). "Death receptor-induced cell killing." *Cell Signal* **16**(2): 139-144.
- Tofaris, G. K., P. H. Patterson, K. R. Jessen and R. Mirsky (2002). "Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF." *J Neurosci* **22**(15): 6696-6703.
- Toftagen, C. (2010). "Patient perceptions associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy." *Clin J Oncol Nurs* **14**(3): E22-28.
- Toyama, S., N. Shimoyama and M. Shimoyama (2017). "The analgesic effect of orexin-A in a murine model of chemotherapy-induced neuropathic pain." *Neuropeptides* **61**: 95-100.
- Trudeau, M. E., J. A. Chapman, B. Guo, M. J. Clemons, R. A. Dent, R. A. Jong, H. J. Kahn, K. I. Pritchard, L. Han, P. O'Brien, L. E. Shepherd and A. M. Parissenti (2015). "A phase I/II trial of epirubicin and docetaxel in locally advanced breast cancer (LABC) on 2-weekly or 3-weekly schedules: NCIC CTG MA.22." *Springerplus* **4**: 631.

- Truini, A. (2017). "A Review of Neuropathic Pain: From Diagnostic Tests to Mechanisms." *Pain Ther* **6**(Suppl 1): 5-9.
- Tsavaris, N., C. Kosmas, M. Vadiaka, P. Kanelopoulos and D. Boulamatsis (2002). "Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes." *Br J Cancer* **87**(1): 21-27.
- Tsukamoto, M., T. Kiso, Y. Shimoshige, T. Aoki and N. Matsuoka (2010). "Spinal mechanism of standard analgesics: evaluation using mouse models of allodynia." *Eur J Pharmacol* **634**(1-3): 40-45.
- Tulving, E. (2001). "Episodic memory and common sense: how far apart?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1413): 1505-1515.
- Tuscher, J. J., J. S. Szinte, J. R. Starrett, A. A. Krentzel, A. M. Fortress, L. Remage-Healey and K. M. Frick (2016). "Inhibition of local estrogen synthesis in the hippocampus impairs hippocampal memory consolidation in ovariectomized female mice." *Horm Behav* **83**: 60-67.
- Ucel, U. I., O. D. Can, U. Demir Ozkay and Y. Ozturk (2015). "Antihyperalgesic and antiallodynic effects of mianserin on diabetic neuropathic pain: a study on mechanism of action." *Eur J Pharmacol* **756**: 92-106.
- Uceyler, N., J. P. Rogausch, K. V. Toyka and C. Sommer (2007). "Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies." *Neurology* **69**(1): 42-49.
- Vacca, V., S. Marinelli, L. Pieroni, A. Urbani, S. Luvisetto and F. Pavone (2014). "Higher pain perception and lack of recovery from neuropathic pain in females: a behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice." *Pain* **155**(2): 388-402.
- Van de Wiel, M., Y. Dockx, T. Van den Wyngaert, S. Stroobants, W. A. A. Tjalma and M. T. Huizing (2017). "Neoadjuvant systemic therapy in breast cancer: Challenges and uncertainties." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **210**: 144-156.
- van der Veldt, A. A., N. H. Hendrikse, E. F. Smit, M. P. Mooijer, A. Y. Rijnders, W. R. Gerritsen, J. J. van der Hoeven, A. D. Windhorst, A. A. Lammertsma and M. Lubberink (2010). "Biodistribution and radiation dosimetry of ¹¹C-labelled docetaxel in cancer patients." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **37**(10): 1950-1958.
- van Hagen, B. T., N. P. van Goethem, D. C. Lagatta and J. Prickaerts (2015). "The object pattern separation (OPS) task: a behavioral paradigm derived from the object recognition task." *Behav Brain Res* **285**: 44-52.
- Van Itallie, C. M., A. S. Fanning, A. Bridges and J. M. Anderson (2009). "ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton." *Mol Biol Cell* **20**(17): 3930-3940.
- Van Steenwinckel, J., A. Noghero, K. Thibault, M. J. Brisorgueil, J. Fischer and M. Conrath (2009). "The 5-HT_{2A} receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia." *Neuroscience* **161**(3): 838-846.
- Vardy, J., J. S. Wefel, T. Ahles, I. F. Tannock and S. B. Schagen (2008). "Cancer and cancer-therapy related cognitive dysfunction: an international perspective from the Venice cognitive workshop." *Ann Oncol* **19**(4): 623-629.
- Velasco, R. and J. Bruna (2015). "Taxane-Induced Peripheral Neurotoxicity." *Toxics* **3**(2): 152-169.
- Venishetty, V. K., R. Komuravelli, M. Kuncha, R. Sistla and P. V. Diwan (2013). "Increased brain uptake of docetaxel and ketoconazole loaded folate-grafted solid lipid nanoparticles." *Nanomedicine* **9**(1): 111-121.
- Venishetty, V. K., R. Samala, R. Komuravelli, M. Kuncha, R. Sistla and P. V. Diwan (2013). "beta-Hydroxybutyric acid grafted solid lipid nanoparticles: a novel strategy to improve drug delivery to brain." *Nanomedicine* **9**(3): 388-397.
- Ventzel, L., A. B. Jensen, A. R. Jensen, T. S. Jensen and N. B. Finnerup (2016). "Chemotherapy-induced pain and neuropathy: a prospective study in patients treated with adjuvant oxaliplatin or docetaxel." *Pain* **157**(3): 560-568.

- Verstappen, C. C., S. Koeppen, J. J. Heimans, P. C. Huijgens, M. E. Scheulen, D. Strumberg, B. Kiburg and T. J. Postma (2005). "Dose-related vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening." *Neurology* **64**(6): 1076-1077.
- Viatchenko-Karpinski, V., J. Ling and J. G. Gu (2018). "Down-regulation of Kv4.3 channels and a-type K(+) currents in V2 trigeminal ganglion neurons of rats following oxaliplatin treatment." *Mol Pain* **14**: 1744806917750995.
- Vichaya, E. G., G. S. Chiu, K. Krukowski, T. E. Lacourt, A. Kavelaars, R. Dantzer, C. J. Heijnen and A. K. Walker (2015). "Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities." *Front Neurosci* **9**: 131.
- Vinik, A., J. Ullal, H. K. Parson and C. M. Casellini (2006). "Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **2**(5): 269-281.
- Voccoli, V. and L. Colombaioni (2009). "Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts." *Brain Res* **1252**: 15-29.
- von Minckwitz, G., G. Raab, A. Caputo, M. Schutte, J. Hilfrich, J. U. Blohmer, B. Gerber, S. D. Costa, E. Merkle, H. Eidtmann, D. Lampe, C. Jackisch, A. du Bois and M. Kaufmann (2005). "Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group." *J Clin Oncol* **23**(12): 2676-2685.
- Vrinten, D. H. and F. F. Hamers (2003). "'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing." *Pain* **102**(1-2): 203-209.
- Wager, T. D. and E. E. Smith (2003). "Neuroimaging studies of working memory: a meta-analysis." *Cogn Affect Behav Neurosci* **3**(4): 255-274.
- Walker, L. G., J. M. Eremin, M. M. Aloysius, W. Vassanasiri, M. B. Walker, M. El-Sheemy, G. Cowley, J. Beer, S. Samphao, J. Wiseman, J. A. Jibril, D. Valerio, D. J. Clarke, M. Kamal, G. W. Thorpe, K. Baria and O. Eremin (2011). "Effects on quality of life, anti-cancer responses, breast conserving surgery and survival with neoadjuvant docetaxel: a randomised study of sequential weekly versus three-weekly docetaxel following neoadjuvant doxorubicin and cyclophosphamide in women with primary breast cancer." *BMC Cancer* **11**: 179.
- Wang, H. L. and T. W. Lai (2014). "Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples." *Sci Rep* **4**: 6588.
- Wang, J. M., P. B. Johnston, B. G. Ball and R. D. Brinton (2005). "The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression." *J Neurosci* **25**(19): 4706-4718.
- Wang, J. M., C. Singh, L. Liu, R. W. Irwin, S. Chen, E. J. Chung, R. F. Thompson and R. D. Brinton (2010). "Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(14): 6498-6503.
- Wang, S. H., Z. J. Zhang, Y. J. Guo, G. J. Teng and B. A. Chen (2008). "Hippocampal neurogenesis and behavioural studies on adult ischemic rat response to chronic mild stress." *Behav Brain Res* **189**(1): 9-16.
- Wang, X. M., T. J. Lehky, J. M. Brell and S. G. Dorsey (2012). "Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy." *Cytokine* **59**(1): 3-9.
- Wang, Y., S. Jin, Y. Sonobe, Y. Cheng, H. Horiuchi, B. Parajuli, J. Kawanokuchi, T. Mizuno, H. Takeuchi and A. Suzumura (2014). "Interleukin-1beta induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes." *PLoS One* **9**(10): e110024.
- Warburton, E. C. and M. W. Brown (2015). "Neural circuitry for rat recognition memory." *Behav Brain Res* **285**: 131-139.
- Warwick, R. A. and M. Hanani (2013). "The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain." *Eur J Pain* **17**(4): 571-580.
- Watkins, L. R. and S. F. Maier (2002). "Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states." *Physiol Rev* **82**(4): 981-1011.
- Watson, C. P., L. Vernich, M. Chipman and K. Reed (1998). "Nortriptyline versus amitriptyline in postherpetic neuralgia: a randomized trial." *Neurology* **51**(4): 1166-1171.

- Watson, J. C. and P. J. Dyck (2015). "Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management." *Mayo Clin Proc* **90**(7): 940-951.
- Wattiez, A. S., F. Libert, A. M. Privat, S. Loiodice, J. Fialip, A. Eschali r and C. Courteix (2011). "Evidence for a differential opioidergic involvement in the analgesic effect of antidepressants: prediction for efficacy in animal models of neuropathic pain?" *Br J Pharmacol* **163**(4): 792-803.
- Wefel, J. S., A. E. Kayl and C. A. Meyers (2004). "Neuropsychological dysfunction associated with cancer and cancer therapies: a conceptual review of an emerging target." *Br J Cancer* **90**(9): 1691-1696.
- Wefel, J. S., J. Vardy, T. Ahles and S. B. Schagen (2011). "International Cognition and Cancer Task Force recommendations to harmonise studies of cognitive function in patients with cancer." *Lancet Oncol* **12**(7): 703-708.
- Weiss, N., A. Tadmouri, M. Mikati, M. Ronjat and M. De Waard (2007). "Importance of voltage-dependent inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins." *Pflugers Arch* **454**(1): 115-129.
- Weng, H. R., J. V. Cordella and P. M. Dougherty (2003). "Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia." *Pain* **103**(1-2): 131-138.
- Wigmore, P. M., S. Mustafa, M. El-Beltagy, L. Lyons, J. Umka and G. Bennett (2010). "Effects of 5-FU." *Adv Exp Med Biol* **678**: 157-164.
- Winocur, G., M. Henkelman, J. M. Wojtowicz, H. Zhang, M. A. Binns and I. F. Tannock (2012). "The effects of chemotherapy on cognitive function in a mouse model: a prospective study." *Clin Cancer Res* **18**(11): 3112-3121.
- Winocur, G., J. Vardy, M. A. Binns, L. Kerr and I. Tannock (2006). "The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluorouracil, on cognitive function in mice." *Pharmacol Biochem Behav* **85**(1): 66-75.
- Wong, D. T., F. P. Bymaster, D. A. Mayle, L. R. Reid, J. H. Krushinski and D. W. Robertson (1993). "LY248686, a new inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake." *Neuropsychopharmacology* **8**(1): 23-33.
- Wong, D. T., D. W. Robertson, F. P. Bymaster, J. H. Krushinski and L. R. Reid (1988). "LY227942, an inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake: biochemical pharmacology of a potential antidepressant drug." *Life Sci* **43**(24): 2049-2057.
- Xiao, W. H., H. Zheng and G. J. Bennett (2012). "Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel." *Neuroscience* **203**: 194-206.
- Yamada, T., N. Egashira, A. Bando, Y. Nishime, Y. Tonogai, M. Imuta, T. Yano and R. Oishi (2012). "Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury." *Free Radic Biol Med* **52**(8): 1285-1293.
- Yamada, T. H., N. L. Denburg, L. J. Beglinger and S. K. Schultz (2010). "Neuropsychological outcomes of older breast cancer survivors: cognitive features ten or more years after chemotherapy." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **22**(1): 48-54.
- Yamamoto, K., N. Chiba, T. Chiba, T. Kambe, K. Abe, K. Kawakami, I. Utsunomiya and K. Taguchi (2015). "Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration." *Mol Pain* **11**: 69.
- Yamamoto, S., T. Kawashiri, H. Higuchi, K. Tsutsumi, S. Ushio, T. Kaname, M. Shirahama and N. Egashira (2015). "Behavioral and pharmacological characteristics of bortezomib-induced peripheral neuropathy in rats." *J Pharmacol Sci* **129**(1): 43-50.
- Yang, M., J. S. Kim, M. S. Song, S. H. Kim, S. S. Kang, C. S. Bae, J. C. Kim, H. Wang, T. Shin and C. Moon (2010). "Cyclophosphamide impairs hippocampus-dependent learning and memory in adult mice: Possible involvement of hippocampal neurogenesis in chemotherapy-induced memory deficits." *Neurobiol Learn Mem* **93**(4): 487-494.
- Yang, Y. H., J. K. Lin, W. S. Chen, T. C. Lin, S. H. Yang, J. K. Jiang, S. C. Chang, Y. T. Lan, C. C. Lin, C. C. Yen, C. H. Tzeng, W. S. Wang, H. L. Chiang, C. J. Teng and H. W. Teng (2012). "Duloxetine improves

- oxaliplatin-induced neuropathy in patients with colorectal cancer: an open-label pilot study." *Support Care Cancer* **20**(7): 1491-1497.
- Yassa, M. A. and C. E. Stark (2011). "Pattern separation in the hippocampus." *Trends Neurosci* **34**(10): 515-525.
- Yen, L. F., V. C. Wei, E. Y. Kuo and T. W. Lai (2013). "Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats." *PLoS One* **8**(7): e68595.
- Yesavage, J. A., M. S. Mumenthaler, J. L. Taylor, L. Friedman, R. O'Hara, J. Sheikh, J. Tinklenberg and P. J. Whitehouse (2002). "Donepezil and flight simulator performance: effects on retention of complex skills." *Neurology* **59**(1): 123-125.
- Yoshimura, M. and H. Furue (2006). "Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord." *J Pharmacol Sci* **101**(2): 107-117.
- Yothers, G., M. J. O'Connell, C. J. Allegra, J. P. Kuebler, L. H. Colangelo, N. J. Petrelli and N. Wolmark (2011). "Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses." *J Clin Oncol* **29**(28): 3768-3774.
- Yu, J., C. Wang, Q. Kong, X. Wu, J. J. Lu and X. Chen (2018). "Recent progress in doxorubicin-induced cardiotoxicity and protective potential of natural products." *Phytomedicine* **40**: 125-139.
- Zampieri, S., S. H. Mellon, T. D. Butters, M. Nevyjel, D. F. Covey, B. Bembi and A. Dardis (2009). "Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone." *J Cell Mol Med* **13**(9B): 3786-3796.
- Zhang, H. and P. M. Dougherty (2014). "Enhanced excitability of primary sensory neurons and altered gene expression of neuronal ion channels in dorsal root ganglion in paclitaxel-induced peripheral neuropathy." *Anesthesiology* **120**(6): 1463-1475.
- Zhang, H., Y. Li, M. de Carvalho-Barbosa, A. Kavelaars, C. J. Heijnen, P. J. Albrecht and P. M. Dougherty (2016). "Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy." *J Pain* **17**(7): 775-786.
- Zhang, L., R. C. Plotkin, G. Wang, M. E. Sandel and S. Lee (2004). "Cholinergic augmentation with donepezil enhances recovery in short-term memory and sustained attention after traumatic brain injury." *Arch Phys Med Rehabil* **85**(7): 1050-1055.
- Zhao, M., K. Isami, S. Nakamura, H. Shirakawa, T. Nakagawa and S. Kaneko (2012). "Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice." *Mol Pain* **8**: 55.
- Zheng, H., W. H. Xiao and G. J. Bennett (2011). "Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy." *Exp Neurol* **232**(2): 154-161.
- Zheng, H., W. H. Xiao and G. J. Bennett (2012). "Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy." *Exp Neurol* **238**(2): 225-234.
- Zitvogel, L., A. Tesniere, L. Apetoh, F. Ghiringhelli and G. Kroemer (2008). "[Immunological aspects of anticancer chemotherapy]." *Bull Acad Natl Med* **192**(7): 1469-1487; discussion 1487-1469.
- Zuccaro, E. and P. Arlotta (2013). "The quest for myelin in the adult brain." *Nat Cell Biol* **15**(6): 572-575.



ANNEXE - Article Soumis

Neuropathic pain after neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: preclinical evaluation of the efficacy of duloxetine and allopregnanolone concomitant treatment using a new rat model

Célia Matta, Ayikoe-Guy Mensah-Nyagan^{§*}, Omar Taleb[§]

Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, INSERM U1119, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Bâtiment 3 de la Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France.

§ Equal contribution as last authors

*Corresponding author contact information: Professor Ayikoé-Guy Mensah-Nyagan

E-Mail: gmensah@unistra.fr; Tel: +33 (0)3 68 85 31 24 or 25; Fax: +33 (0)3 68 85 35 70

Keywords: Chemotherapy-induced painful neuropathy; Duloxetine; Neoadjuvant chemotherapy; Neuroprotection; allopregnanolone and duloxetine synergic action

24 pages; 9 figures; 1 table

Abstract

Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is a standard beneficial treatment against breast cancer. Unfortunately, NAC toxicity causes painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) which decreases patients' quality of life and jeopardizes the treatment success. Development of effective therapy against painful CIPN remains a crucial need because current treatments are unsatisfactory. While animal models have previously been produced to investigate new strategies against CIPN, neuropathic pain evoked by the frequently used NAC-protocol involving sequentially epirubicin (EPI) and docetaxel (DO) has never been modeled. Moreover, duloxetine (DU), a serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor has optimistically been recommended for painful CIPN treatment but DU exhibits controversial efficacy and adverse effects requiring its discontinuation in some patients. Here, we first used a multidisciplinary approach to generate a rat model of (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN. Using this model, we investigated the possibility to optimize the efficacy of DU treatment against painful CIPN. We tested a combination of low doses of DU (2mg/kg/2days) and allopregnanolone (AP, 4mg/kg/2days), a promising neuroprotector, and observed that this concomitant therapy (DUAP) was more effective than separate administrations of DU or AP to prevent (EPI+DO)-NAC-induced cold allodynia, mechanical allodynia/hyperalgesia, electrophysiological and histological alterations of peripheral nerves. Interestingly, we found that DUAP or AP, but not DU, also prevented (EPI+DO)-NAC-induced Schwann cell dedifferentiation and related macrophage (CD11b/c-positive cells) infiltration in sciatic nerves. Altogether, our results suggest that DU and AP (or AP analogs) concomitant treatment may represent a promising therapeutic option to counteract efficiently painful CIPN or (EPI+DO)-NAC-evoked peripheral nerve tissue damages and dysfunctions.

Introduction

Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is widely used standard treatment for locally advanced breast cancer at inoperable stages [8; 37; 68; 72]. By inducing a net tumor shrinking, NAC offers attractive benefits as it increases the rate of breast-conserving surgery and improves surgical resection [8; 61; 68; 76]. Introducing taxanes, a microtubule stabilizing agents that block cell cycle [49], in NAC treatment significantly increased disease free and survival rate [1; 22] than the topoisomerase II inhibitors anthracyclines alone [63]. This leads the most described NAC setting using sequentially epirubicin (EPI) and docetaxel (DO) among the most beneficial protocols in breast cancer treatments [18]. Unfortunately, taxane toxicity (even the less toxic DO) is associated with numerous deleterious side effects including neurotoxic effects that cause the well known chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN), a generic disease covering a variety of common and/or specific sensorimotor symptoms depending on the neurotoxic mechanisms evoked by various chemotherapeutic drugs. The severity of CIPN, predominantly related to sensory alterations characterized by neuropathic pain and paresthesias, is cumulative dose-dependent and may chronically persist for several years after withdrawal of the anti-tumor treatment [14]. DO neurotoxicity induces CIPN in about 65 % of patients, 30% of whom are chronically affected [13; 60; 70], and this situation usually requires a dose-reduction or early discontinuation of the chemotherapeutic treatment [14; 23]. In the sequential (EPI+DO)-NAC used for breast cancer treatment [21; 37], DO-evoked toxicity may be worsened by an additional EPI-related neurotoxicity and this may considerably affect for the long-term patients' quality of life since neuroprotective drugs to prevent efficiently painful CIPN are still missing although many attempts have been made with various compounds that are not fully satisfactory but induce themselves several adverse effects [9; 53].

The currently available drugs for CIPN treatment are tricyclic antidepressants, gabapentinoids and serotonin-noradrenalin reuptake inhibitors [3; 23; 32]. Duloxetine (DU) a serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor antidepressant having some beneficial effects in diabetic neuropathic pain is currently recommended for CIPN treatment [5; 52]. However, DU doses (30 mg/day for one week followed by 60 mg/day for 4 weeks), supposed to be well tolerated, only partially reduce painful CIPN and about 20 % of patients generally discontinue DU before the end of treatment because of adverse

effects [23; 38; 64; 77]. Increasing DU doses did not enhance its efficacy against CIPN [38] but rather increased the rate and severity of its side-effects [24; 38; 57]. Therefore, to improve DU efficacy against painful CIPN without increasing its adverse effects, we hypothesized that the combination of active low doses of DU with the natural neurosteroid allopregnanolone (AP), which induces neuroprotection in human and various experimental models with no toxicity, may represent an interesting option [7; 25; 42-46; 55; 56; 59; 66]. In support of this idea, previous studies revealed that AP exerted beneficial effects against vincristine, paclitaxel and oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in rats [44-46; 56; 66]. Taken together, these data suggest that AP and DU may concomitantly exert potent protective effects against (EPI+DO)-NAC-induced neuropathic pain. To test our hypothesis, we first generated and characterized behaviorally, electrophysiologically and histopathologically a rat model of sequential (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN, because to our knowledge this model was not previously described. Using this new model, we investigated and compared the efficacy of DU (2mg/kg/2days) alone, AP (4mg/kg/2days) alone and concomitant DU and AP treatment (DUAP) to prevent (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN symptoms, including cold allodynia, mechanical allodynia/hyperalgesia, peripheral nerve tissue damages and abnormalities of nerve action potential and conduction velocity.

Materials and methods

Animals

Adult female Sprague-Dawley rats weighting 175-200 g were used. Animals were obtained from a commercial source (Janvier, Le Genest St Isle, France) and housed under standard laboratory conditions in a 12/12 h light/dark cycle with food and water ad libitum. Animals were allowed a one week acclimatization period before experiments.

Ethic statement

Animal care and manipulations were performed according to The European Community Council Directives (86/609/EC) and under the supervision of authorized investigators. All experiments were performed minimizing the number of animals used and their suffering in accordance with the Alsace

Department of Veterinary Public Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Agreement number 67-186). The experiments also followed the International Association for the Study of Pain ethical guidelines.

Drugs

Epirubicin Hydrochloride (EPI; Carbosynth Limited, UK) was dissolved in saline 30 minutes at 30°C, stored at 4°C and protected from light. Saline was used as vehicle (veh).

Docetaxel (DO; Carbosynth Limited, UK) was dissolved in a mixture of ethanol-Tween80 (v/v: 50/50%) at a concentration of 20 mg/mL. Just before injection, this mixture was diluted at 2 mg/mL with a 5% glucose containing water solution (v/v/v: 5/5/90%). Control rats were injected with the vehicle used for DO 'ethanol-Tween80-5% glucose in water' (v/v/v: 5/5/90%).

Duloxetine and allopregnanolone (DU and AP respectively; Carbosynth Limited, UK) were diluted in hydroxypropylcellulose or HPC 0.3% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in water, that was used as vehicle (veh).

Animal treatment

Before the onset of treatment at day 0 (D0) the basal mechanical and cold thermal sensitivities of the animals were assessed and groups of homogeneous sensitivity were constituted. Five groups of six animals were treated as follow: vehicle-vehicle group (veh-veh), (EPI+DO)-NAC+vehicle-treated or chemo-vehicle group (c-veh), (EPI+DO)-NAC+DU-treated or chemo-Duloxetine group (c-DU), (EPI+DO)-NAC+allopregnanolone-treated or chemo-allopregnanolone group (c-AP) and EPI+DO)-NAC+Duloxetine+AP-treated or chemo-Duloxetine+AP group (c-DUAP). Behavioral tests were performed before the injections, at D21, D28 and D34, to follow the evolution of mechanical and cold thermal sensitivities.

Preventive treatment with DU, AP or DUAP started one week prior to chemotherapy, initiated immediately after the first basal nociceptive tests and lasted up to the end of the chemotherapy period. So, animals were intraperitoneally (i.p) injected every-2 days during 4 weeks, with 2 mg/kg/injection and/or 4 mg/kg/injection for DU and AP respectively. Treatments were therefore performed at D0, D2, D4, D6, D8, D10, D12, D14, D16, D18, D20, D22, D24, D26 and D28. Thus, animals received a

cumulative dose of 30 mg/kg and/or 60 mg/kg of DU and AP respectively. Control rats were injected with the vehicle (1 mL/kg) according to a similar schedule.

Chemotherapy was administered during 3 weeks starting at D7. Thus, animals were sequentially dosed with EPI (1 mg/kg/injection) and DO (2 mg/kg/injection) by i.p. route every-2 days during the first and two following weeks of the chemotherapy period respectively. EPI was therefore given at D7, D9, D11 and D13 and DO at D14, D16, D18, D20, D22, D24, D26, and D28. Thus, the animals received a sequential cumulative dose of 4 mg/kg and 16 mg/kg of EPI and DO respectively. Control rats were injected with the vehicle (1 mL/kg) according to a similar schedule.

Nociceptive behavioral tests

Nociceptive tests were done as previously described [45]. Briefly, mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed using the von Frey filaments (Stoelting, Wood Dale, IL) and cold allodynia by the acetone test.

The mechanical nociceptive sensitivity was measured in individual rats placed in a setup allowing access to the plantar surface of the hind paws consisting of Plexiglas® bottomless boxes upon an elevated metal grid. Calibrated von Frey hairs of 4, 15 or 26 g were applied to the plantar surface of the hind paw with increasing pressure until the filament bends. The tested filament was applied for a period of 1-2 s and the procedure was repeated five times at 4-5 s intervals. A response was considered as positive only if we observe a robust and immediate withdrawal followed by a licking of the paw. Thus, for each von Frey hair, the number of withdrawals was noted and the percentage of response calculated. Veh-veh rats had no response to the 4 g stimulus but responded up to 15 to 20% or 35 to 40% to the 15 or 26 g stimulus respectively. Therefore, animals responding to a 4 g stimulus developed a mechanical allodynia symptom. Increased level of responses to 15 or 26 g is indicative of mechanical-hyperalgesia.

For cold thermal nociceptive sensitivity, rats were placed on the same setup allowing access to the plantar surface of the hind paw described above. Using a Hamilton syringe provided with a catheter, a drop of fifty microliters of acetone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was sprayed onto the plantar skin

of each hind paw. Rats were observed during a period with a cut off time of 20 s after the onset of the acetone spray. The latency is measured for each typical positive response that is a withdrawal followed by a licking of the hind paw. Control rats did not exhibit any response to the stimulus during the observation period or occasionally responded with a small withdrawal taking place lately without licking the hind paw. In contrast, neuropathic animals responded during the observation period with an intense withdrawal followed by a licking of the hind paw. A mean latency per animal was calculated on the basis of six separate measures (three per paw) at a given time point.

Between each test session the testing boxes were thoroughly cleaned using 70% ethanol.

Electrophysiological studies

Sciatic nerve action potential (NAP) recording was performed as previously described [44]. Briefly, sciatic nerves were rapidly dissected from decapitated rats under urethane anesthesia (25%, 0.5 ml/100g) and immersed in saline medium (NaCl 133, KCl 2, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, HEPES 10 and glucose 10 pH 7.4) 5 min before recording. The sciatic nerve was then put on chlorinated silver electrodes (homemade electrodes holder chamber). Square-shaped stimulating pulses of 0.1 ms duration generated by Clampex routine of the Pclamp software package (Axon Instruments, CA, USA) were applied to the distal end of the nerve through a Digidata 1322A interface (Axon Instruments, CA, USA). NAPs were recorded at the proximal end of the nerve ($\Delta x = 24$ mm distance from the stimulating active electrode) using an ISO-DAM8A differential amplifier (World Precision Instruments, UK). The signal was filtered with a bandwidth of 10 to 10,000 Hz and digitized at 500 kHz. Artifact of stimulation was obtained in isolation using a double pulse protocol and subtracted from recorded NAPs before analysis with Pclamp software. Nerve conduction velocity (CV) was calculated using the latency between the beginning of stimulus artifact and the NAP onset (Δt) according to the equations:

$$CV = \Delta x / \Delta t$$

Immunohistochemical studies

For immunohistochemical studies the sciatic nerves were rapidly dissected and post-fixed in 4 % paraformaldehyde for 24 h. The tissues were immersed in 15 % sucrose containing phosphate buffer (PB) for 24 h and for another 24 h into 30 % sucrose PB. Sciatic nerves were then placed in embedding medium (OCT, Tissue-Tek, Reichert-Jung, Nussloch, Germany) and frozen at -80°C. Sagittal or longitudinal sections (10-µm thick) were cut using a cryostat CM 1950 (Leica biosystems, Nanterre, France) and mounted on glass slides superfrost plus (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Tissue sections were pre-incubated for 2 hours with 5 % normal goat serum (NGS) in PB used as blocking solution, before incubation overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody against neurofilament 200 (NF200; Clone N52; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), a mouse monoclonal antibody against CD11b/c (Abcam, Paris, France) or a rabbit polyclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP; Abcam, Paris, France) diluted at 1:250, 1:750 and 1:1000 respectively in 5%-NGS. The procedure was followed by rinsing all tissue sections 3 times in PB (10 min/rinse) and transferring them for 1 hour into Alexa-488-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (Abcam, Paris, France) diluted at 1:500 and 1:1000 respectively in blocking solution. Finally, tissue sections were rinsed 3 times in PB (5min/rinse) and mounted in Glycerol mounting medium with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) and DABCO (Abcam, Paris, France).

Preparations were examined under a multichannel laser-scanning microscope (Olympus DP73, Hambourg, Allemagne). Using ImageJ software, the mean gray value of NF200 and GFAP immunoreactivity was determined in several counting squares, DAPI stained nuclei and CD11b/c positive cells were counted on longitudinal sections of sciatic nerves isolated from each experimental group. Results were expressed as percent of control (+ SEM) and as number of cell/mm² (+ SEM).

Western blotting studies

Sciatic nerves for western blot were immediately frozen at -80°C in dry ice. For protein extraction, EDTA/HEPES lysis buffer supplemented with protease inhibitors (complete ULTRA Tablets EDTA-free; Roche, Bâle, Suisse) was used, and protein lysates were cleared by centrifugation at 10000 × g. Protein extract (20 µg per lane) were separated by electrophoresis on a 4-20 % precast polyacrylamide

gel (mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ gels, Bio-Rad) and transferred onto a PVDF membrane in Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Membranes were blocked and subsequently incubated overnight at 4°C with primary antibodies against neurofilament NF200, or α -tubulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Chemiluminescent detection was performed with secondary antibodies mouse-IgG-H.R.P (Abliance, Compiègne, France) using Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) in a Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System. Normalized NF200 signal to reference protein were analyzed using Image Lab™ Software. Results were expressed as percent of control (+ SEM).

Statistical analyses

ANOVAs, Multiple T-test and unpaired T-test were used. Data were analyzed with Prism 6 (GraphPad software). Statistical significance was considered as usual at $p < 0.05$.

Results

Effects of (EPI+DO)-NAC on mechanical and cold thermal sensitivities

Mechanical sensitivity of the animals was assessed by using von Frey hairs test. The sensitivity level of the animals was quantified by calculating the percentage of paw withdrawal in response to repeated stimulations by von Frey filaments.

Before the onset of treatment, the animals had no response to a 4 g von Frey filament stimulation. For 15 and 26 g von Frey filament stimulations, the observed responses were 20 ± 12 and 37 ± 11 % respectively. For animals receiving the vehicle (veh-veh group), the rate of withdrawal responses remained unchanged all along the treatment period (**Figure 1A-C**). In contrast, from D21 i.e two weeks after the onset of (EPI+DO)-NAC-treatment, chemo-treated rats (c-veh group) responded to a 4 g von Frey hair with a significantly higher frequency (from 0 % before chemotherapy treatment to 18 ± 7 %; $p < 0.05$), that reached a mean maximal plateau value of 28 ± 10 % ($p < 0.05$) from D28 to

the end of the experiment (**Figure 1A**). This increased paw withdrawal frequency reflects the installation of mechanical allodynia in c-veh animals. We also observed a mechanical hyperalgesia by using stronger von Frey filaments of 15 and 26 g. Indeed, (EPI+DO)-NAC-treated or c-veh animals responded increasingly to the 15 and 26 g hairs from 21.6 and 38.3 to 47 ± 10 and 68 ± 5 % ($p < 0.05$ compared to veh-veh) at D0 and D34 respectively (**Figure 1B & 1C**).

Altogether, these results show that (EPI+DO)-NAC treatment induced mechanical allodynia and hyperalgesia, which started two weeks after the onset of the chemotherapy and persisted at least 1 week after its end.

(EP+DO)-NAC-treatment also induced cold thermal allodynia that was assessed here by the acetone test. At D0, before NAC onset, no paw withdrawal response to acetone spray was seen before the cutoff time of 20 s, and this remained unchanged all along the experiment in control animals indicating that acetone spray is normally not noxious for the rats. In contrast, c-veh animals responded to acetone spray from D21 to the end of the experiment with decreasing withdrawal latency from 17.7 ± 0.8 s at D21 to a mean value of 12.9 ± 1.4 s at D28. The latter value being significantly different when compared to that seen with the veh-veh group (19.9 ± 0.1 s; $p < 0.05$) (**Figure 1D**).

(EPI+DO)-NAC-induced alterations of sciatic nerve action potential

Nerve action potential (NAP) parameters and conduction alterations are generally associated to CIPN. NAP maximal amplitude and conduction velocity (CV) parameters were analyzed in this study. Both parameters were affected by (EPI+DO)-NAC-treatment leading to a sharp decrease of the maximal NAP peak amplitude (**Figure 2A**) and a modest reduction of CV (**Figure 2B**). Overall mean values of 4.0 ± 0.6 and 2.1 ± 0.3 mV and 45.6 ± 0.6 and 37.6 ± 0.9 m/s were obtained for veh-veh and c-veh rats ($p < 0.005$ and $p < 0.0001$) corresponding to a reduction of 47.5 and 17.5 % respectively.

NF200 protein level in sciatic nerve fibers is decreased by (EPI+DO)-NAC treatment

NAP peak amplitude is directly linked to the number of functionally recruitable fibers. Thus, reduction of the maximal NAP peak amplitude suggests a decrease in the number of functional nerve fibers induced by a possible axonopathy.

To determine whether (EPI+DO)-NAC-treatment alters the structural organization of peripheral axons, we used immunohistochemical procedure to evaluate the expression level of the neuronal cytoskeleton protein neurofilament 200 kD (NF200) in sciatic nerve axons. As expected, our results show that the chemo-treatment strongly decreased NF200-immunostaining in sciatic nerve axons (**Figure 3A**) as compared to control. Quantitative analysis using Image-J software, of the mean fluorescence intensity revealed a 60 % decrease of NF200-immunostaining in sciatic nerve dissected from c-veh animals compared to controls ($p < 0.005$) (**Figure 3B**). This result was confirmed by western blot analysis which revealed a decrease of about 55 % of NF200 in the protein extract from sciatic nerves of (EPI+DO)-NAC-treated rats compared to vehicle group ($p < 0.005$) (**Figure 3C & 3D**).

Protective effects of DU, AP and DUAP against (EPI+DO)-NAC-induced neuropathic pain symptoms

Because in clinical practice DU exhibits some partial beneficial effects against CIPN, and given the fact that CIPN generally results from complex neurotoxic mechanisms that are both anticancer drug- and cumulative dose-dependent, it makes sense that DU may target and prevent only certain aspects of this multiparametric phenomenon. Thus, our idea to combine DU treatment with AP, which exerts neuroprotective effects through a broad spectrum of mechanisms of action [7; 25; 42-46; 55; 56; 59; 66], raised the expectation to tackle all or most components of (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN. Previous clinical trials and studies performed by the manufacturers of DU and various other groups showed that doses of 60 mg and 120 mg daily are effective for treating pain in diabetic peripheral neuropathy and CIPN but lower daily doses are not [23; 38; 64; 77]. Daily active doses of DU (60-120 mg/daily) generally used in adult humans for a minimum of 35 days (5 weeks) correspond to a dose regimen ranging from 1 to 2 mg/kg/day. To secure our experiments and avoid potential toxicity evoked by cumulative DU doses, we decided to administer DU in rat every 2 days at 2mg/kg (which actually corresponds to 1 mg/kg/day) but only for 14 days. Regarding AP, while previous studies have shown that doses up to 30 mg/kg/day of this natural neurosteroid are not toxic, we chose to use the very low dose of 4 mg/kg/2days that appeared highly effective to prevent/suppress vincristine- and oxaliplatin-induced painful CIPN [38; 44; 46; 64]. Therefore, in the present study, DU (2

mg/kg/2days) and AP (4 mg/kg/2days) were given separately or concomitantly and each animal group received a total of 14 injections.

Mechanical allodynia

While all animals treated with chemotherapy developed a mechanical allodynia, c-DUAP-, c-DU- or c-AP-treated rats had a significant decrease in paw withdrawal response to 4 g von Frey filament compared to the c-veh group at D34 (3 ± 2 % ($p < 0.001$), 12 ± 3 % ($p < 0.05$) and 7 ± 7 % ($p < 0.005$) respectively compared to 28 ± 9 % obtained for c-veh animals (**Figure 4A**).

The distribution of symptom severity (**Table 1A**) shows that 67 % and 83 % of c-DUAP- and c-AP-treated animals did not develop mechanical allodynia. DUAP and AP treatments prevented efficiently its occurrence. In contrast, only 17 % of c-DU animals did not develop mechanical allodynia, whereas the rest of the animals (83 %) had only a reduction in symptom severity (**Table 1A**). Thus, DU treatment prevented only partially the (EPI+DO)-NAC-induced mechanical allodynia.

Mechanical hyperalgesia

On average, paw withdrawal responses to 26 g von Frey filament obtained for c-DU- and c-AP-treated rats (58 ± 12 and 52 ± 7 % respectively) were not significantly different compared to c-veh group (68 ± 5 %) (**Figure 4B**). However, analysis of symptom severity distribution (**Table 1B**) revealed here again a decreased symptom severity obtained with DU and AP. Indeed, while 66 % of c-veh rats had a grade 3, only 17 % of c-DU and none of c-AP-treated animals developed such a hyperalgesia severity. In addition, 33 % of c-DU- and 17 % AP-treated rats did not develop the symptom while all the c-veh animals had at least a grade 1 hyperalgesia. Thus, DU and AP treatment partially prevented chemotherapy-induced mechanical hyperalgesia but overall decreased its severity. In contrast, DUAP combination reduced significantly the paw withdrawal response (28 ± 5 %) compared to c-veh group ($p < 0.005$), and fully prevented NAC-evoked hyperalgesia in all animals (**Figure 4B** and **Table 1B**).

Cold thermal allodynia

Here again, DU- and AP-treatment did not prevent (EPI+DO)-NAC-induced cold thermal allodynia and paw withdrawal latencies in response to the acetone spray, had mean values of 15.5 ± 1.1 and 15.0 ± 0.7 s respectively, that are not statistically different to that obtained for the c-veh group (12.9 ± 1.4 s) (**Figure 4C**). However, DU and AP treatment reduced overall symptom severity as compared to c-veh rats (**Table 1C**). Interestingly, the DUAP combination fully prevented the development of the symptom and a mean latency of 17.7 ± 1.0 s was obtained, a value close to that seen in the veh-veh group (19.9 ± 0.1 s) (**Figure 4C** and **Table 1C**).

In conclusion, DU and AP prophylactic treatments revealed only a partial efficacy against (EPI+DO)-NAC-induced sensory alterations while DUAP combination prevented in all rats the occurrence of neuropathic symptom severity higher than grade 1. Thus, DUAP treatment efficiently prevented the onset of (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN.

Protection of DU, AP and DUAP treatment against (EPI+DO)-NAC-induced alterations of sciatic nerve action potential

(EPI+DO)-NAC-induced NAP peak amplitude reduction was partially prevented by DU or AP treatment, albeit the data are not statistically different neither from those of c-veh group nor from the veh-veh group (**Figure 5A**). In contrast, DUAP concomitant treatment fully prevented this (EPI+DO)-NAC-induced NAP alteration and a mean value of 93 ± 15 % of control was obtained as compared to the control value of 100 ± 14 % of control (**Figure 5A**).

All treatments (DU, AP and DUAP) protected against (EPI+DO)-NAC-induced conduction velocity alteration and mean values of 95 ± 4 , 94 ± 3 and 95 ± 1 % of control were obtained respectively, which are similar to the veh-veh group (100 ± 1 % of control) and statistically different from that obtained for the c-veh group (82 ± 2 % of control) (**Figure 5B**).

DU, AP and DUAP protection against (EPI+DO)-NAC-induced decrease of NF200 protein level

Animals treated with DUAP combination (c-DUAP group), DU (c-DU group) or AP (c-AP group) had an NF200 immunoreactivity in sciatic nerve of 88 ± 5 , 86 ± 5 and 97 ± 12 % of control respectively,

that are statistically different from the c-veh group value (41 ± 12 %; $p < 0.05$) (**Figure 6A & 6B**). Similarly, western blot analysis of NF200 protein (**Figure 6C & 6D**) revealed a protein level comparable to control (veh-veh group) with relative to control mean values of about 97 ± 22 , 99 ± 14 and 99 ± 26 % respectively, which are statistically different from the c-veh animals (45 ± 9 %; $p < 0.05$).

(EPI+DO)-NAC-evoked increased density of cell nuclei, CD11b/c positive cells and GFAP immunoreactivity in sciatic nerves: inhibitory effect of AP and DUAP but not DU treatment

The behavioral, functional and biochemical results described above revealed the occurrence of differences between the effects of concomitant DUAP and those of AP or DU alone. While all these treatments prevented (EPI+DO)-NAC-evoked cytoskeleton alteration in sciatic nerve axons, only the combination DUAP fully protected against CIPN symptoms. These results suggest that the combined therapy DUAP is able to tackle a broad spectrum of mechanisms that may not be targeted only by DU or AP alone. Interestingly, emerging evidence indicate that pro-inflammatory cytokines could also be implicated in the pathogenesis of peripheral neuropathy through promoting macrophage infiltration and neuro-inflammation [69; 74]. To assess the possible involvement of macrophage infiltration in sciatic nerve, we first evaluated the DAPI stained cell nuclei density (**Figure 7A-F**). Data show an increased number of nuclei for c-veh and c-DU groups (137.9 ± 6.3 % and 132 ± 6.7 % of control group respectively; $p < 0.005$). In contrast, c-DUAP- and c-AP-treated rats had no significant difference with the control group (102.6 ± 5.3 % and 107.5 ± 5.6 % of veh-veh group respectively). This result suggests a cellular infiltration in sciatic nerves induced by (EPI+DO)-NAC-treatment that was confirmed by the macrophage marker CD11b/c immunostaining revealing more than 5-fold (284 ± 8 as compared to control 52 ± 19 cells/mm²) increase of positive cells in sciatic nerves (**Figure 8A-G**). This significantly increased number of CD11b/c positive cells was efficiently prevented by AP and DUAP but not by DU treatments (86 ± 24 , 49 ± 6 and 205 ± 14 cells/mm² respectively). Moreover, macrophage infiltration/activation has been demonstrated to be induced by Schwann cell dedifferentiation that may result from a pro-inflammatory state evoked by chemotherapeutic

treatments [12; 28; 33; 69; 74]. We observed that c-veh group and DU-treated rats (c-DU group) had an increased glial fibrillary acid protein (GFAP) immunoreactivity in sciatic nerves compared to veh-veh group (164 ± 18 , 130 ± 21 and 100 ± 10 mean gray value expressed in percentage of control respectively) (**Figure 9A-F**). In contrast, c-DUAP (84 ± 6 %) and c-AP-treated rats (81 ± 8 %) showed no statistical difference with the control group (**Figure 9A-F**).

Discussion

In the present study, we produced and characterized for the first time an experimental rat model of painful CIPN evoked by the sequential (EPI+DO)-NAC treatment frequently used against breast cancer [15; 17; 21; 31; 37; 70]. By using a 3 weeks NAC treatment schedule (one week EPI at 1mg/kg/2d follow by 2 weeks DO at 2mg/kg/2d), we reproduced in rats neuropathic pain with symptoms similar to those observed in human clinical practice [58; 65]. Indeed, after treatment with (EPI+DO)-NAC, the rats developed sensory abnormalities such as mechanical allodynia and hyperalgesia, and cold thermal allodynia. Clinically, objective neurophysiological assessment of CIPN involves nerve conduction studies which provide valuable information about the extent of axonal dysfunction in patients with CIPN [54]. The reduction of nerve action potential (NAP) maximal amplitude is a common finding in patients with NAC-induced CIPN, confirming the development of an axonal aspect of the neuropathy [54]. In the present work, we observed NAP conduction alterations in (EPI+DO)-NAC-treated rats, leading to a sharp (more than 50 %) decrease of the NAP maximal amplitude and a modest (20 %) reduction of the conduction velocity. In addition, these neuropathy-associated neurological symptoms are correlated to a decreased expression of the specific neuronal marker neurofilament 200 Kd in sciatic nerves. Taken together, our results show that (EPI+DO)-NAC treatment induced in rats an axonopathy which mimics the one observed in patients [6; 11] and is characterized by a functional axonal loss in peripheral nerves. This reliable rat model was extremely useful to assess and compare the efficacy of DU, AP and concomitant DUAP on various behavioral, electrophysiological, immunohistochemical and molecular parameters altered by (EPI+DO)-NAC. To date, a National Cancer Institute-sponsored study, evaluating the use of DU as a treatment for

established CIPN, has provided clearly positive results [62; 64]. But in a subset analysis, the beneficial effect of DU was modest and appeared to be more prominent in oxaliplatin-induced neuropathy compared to taxane [39; 64]. In line with this subset analysis, the present work also shows only a partial and modest protective effect of DU which decreased only the severity of (EPI+DO)-NAC-induced neuropathic pain symptoms.

AP was more effective than DU although AP also exerted only partial beneficial protective effects in the rat model of (EPI+DO) NAC-painful CIPN. This observation reveals that AP does not have the same efficacy against all subtypes of CIPN. Indeed, while previous studies from our laboratory demonstrated that AP (4mg/kg/2days) was able to completely suppress oxaliplatin- and vincristine-induced sensory and motor symptoms [44; 45; 66], the present report shows only partial beneficial effects of AP against (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN. Beyond the fact that neurotoxic mechanisms involved in CIPN are anticancer drug- and cumulative dose-dependent [2; 20; 29; 65], it is important to recall that, while in the present work female rats were utilized to produce the model of breast cancer treatment (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN, previous studies of AP actions against oxaliplatin and vincristine-evoked CIPN have used male rats. Therefore, it appears that AP efficacy against CIPN may depend on both gender differences and on the specificity of anticancer drug-evoked neurotoxic mechanisms. In support of this idea, significant sex-related differences have been evidenced in the development and recovery from neuropathic pain in mice, and the regenerative process subsequent to the injury was faster in males than in females [71]. Another study from DeLeo and Rutkowski showed that the mechanical allodynia was significantly greater in female Sprague-Dawley rats as compared with males following a spinal nerve transection [10].

The present study also shows macrophage (CD11b/c positive cells) infiltration of the sciatic nerves and dedifferentiation of Schwann cells evidenced by an increased expression of GFAP. These results suggest that additive toxicities of EPI and DO used in sequential (EPI+DO)-NAC may contribute to a pro-inflammatory state. Indeed, previous observations showed that immune-mediated processes involved in CIPN may generate peripheral nerve inflammation [33]. Also, growing evidence are supporting a significant role of neuroinflammation in CIPN and central nervous system alterations as chemotherapeutic drugs, which can penetrate and accumulate in peripheral axons, may also cross the

blood-brain barrier under certain circumstances [19; 40; 41; 54; 75]. It has also been shown that chemotherapy and/or its neurotoxicity activates Schwann cells which respond with phenotypic changes including GFAP overexpression [4; 27; 50]. This process allows macrophage recruitment in peripheral nerves [28; 33]. In addition to stimulate mediator secretion via macrophage recruitment, Schwann cells themselves release pro-inflammatory factors that increase neuronal excitability and evoke pain hypersensitivity [33; 47]. The overproduction of cytokines and/or prolonged neuroinflammation may cause permanent damages to the nervous tissue and induce neuropathic pain [12; 50]. Concurrently, it has been suggested that immune cell infiltration and pro-inflammatory cytokine activity in peripheral nerves and dorsal root ganglia are implicated in neuropathic pain and CIPN [35; 36; 40; 48; 78]. Interestingly, we found that concomitant DUAP protects efficiently against macrophage (CD11b/c positive cells) infiltration in sciatic nerves and Schwann cell dedifferentiation, suggesting that the spectrum of mechanisms of action covered by concomitant effects of DU and AP is sufficient to prevent chemotherapy-induced neuroinflammatory alterations. Moreover, it has been demonstrated that both DU and AP exert neuroprotective actions against oxidative stress and cell death that might be generated by NAC treatment; these neuroprotective effects may involve different mechanisms including the GABAA-R, Akt/Nrf2/HO-1 pathways and/or other not yet identified targets [16; 67]. Repeated DU treatment also modulates nociception by increasing the α 2-adrenergic-dependent central descending pathway [26] and AP may prevent neuroinflammation by reducing immune cells proliferation [51]. Altogether, these data suggest that the combination of DU and AP may assemble a wide variety of possibilities allowing an efficient multi-target-based strategy against the complex neurotoxic mechanisms involved in CIPN. In agreement with this idea, the present work shows that the combined therapy DUAP successfully prevents several parameters altered by (EPI+DO)-NAC, including cold allodynia, mechanical allodynia/hyperalgesia, nerve action potential, nerve conduction velocity, Schwann cell dedifferentiation, macrophage infiltration of sciatic nerves and neuronal marker NF200 expression in peripheral nerves.

Although previous data have shown that AP dose regimen used in the present work did not induce proliferation of rat skin tumor generated with Walker 256 breast carcinosarcoma cells [44], the exploitation of AP in clinic to improve DU efficacy against (EPI+DO)-NAC-evoked painful CIPN in

breast cancer patients must be evaluated with serious attention. Indeed, other studies revealed that AP may promote neural stem cell proliferation even though this effect completely shifted to anti-proliferative action at certain AP doses [73]. Interestingly, recent investigations allowed the characterization of new analogs of AP among which some exert potent neuroprotective effects with no proliferative activity [30; 34; 67]. Therefore, if necessary, these AP analogs may offer interesting additional possibilities to secure the translation to clinic of the concomitant DUAP-based strategy revealed by the present preclinical work as a highly effective and promising therapy against (EPI+DO)-NAC-induced painful CIPN.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was financially supported by INSERM, CNRS, Université de Strasbourg and the Association Ti'Toine de Normandie.

References

- [1] Abrial SC, Penault-Llorca F, Delva R, Bougnoux P, Leduc B, Mouret-Reynier MA, Mery-Mignard D, Bleuse JP, Dauplat J, Cure H, Chollet P. High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(3):255-263.
- [2] Argyriou AA, Kyritsis AP, Makatsoris T, Kalofonos HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature. *Cancer Manag Res* 2014;6:135-147.
- [3] Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, European Federation of Neurological S. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 2010;17(9):1113-e1188.
- [4] Berg A, Zelano J, Pekna M, Wilhelmsson U, Pekny M, Cullheim S. Axonal regeneration after sciatic nerve lesion is delayed but complete in GFAP- and vimentin-deficient mice. *PLoS One* 2013;8(11):e79395.
- [5] Brewer JR, Morrison G, Dolan ME, Fleming GF. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Current status and progress. *Gynecol Oncol* 2016;140(1):176-183.
- [6] Chaudhry V, Rowinsky EK, Sartorius SE, Donehower RC, Cornblath DR. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. *Ann Neurol* 1994;35(3):304-311.

- [7] Ciriza I, Carrero P, Frye CA, Garcia-Segura LM. Reduced metabolites mediate neuroprotective effects of progesterone in the adult rat hippocampus. The synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (Provera) is not neuroprotective. *J Neurobiol* 2006;66(9):916-928.
- [8] Connolly RM, Stearns V. Current approaches for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Pharmacol* 2013;717(1-3):58-66.
- [9] Cruccu G, Truini A. A review of Neuropathic Pain: From Guidelines to Clinical Practice. *Pain Ther* 2017;6(Suppl 1):35-42.
- [10] DeLeo JA, Rutkowski MD. Gender differences in rat neuropathic pain sensitivity is dependent on strain. *Neurosci Lett* 2000;282(3):197-199.
- [11] Dougherty PM, Cata JP, Cordella JV, Burton A, Weng HR. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain* 2004;109(1-2):132-142.
- [12] Dubovy P, Klusakova I, Hradilova Svizenska I. Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. *Biomed Res Int* 2014;2014:691041.
- [13] Eckhoff L, Feddersen S, Knoop AS, Ewertz M, Bergmann TK. Docetaxel-induced neuropathy: a pharmacogenetic case-control study of 150 women with early-stage breast cancer. *Acta Oncol* 2015;54(4):530-537.
- [14] Eckhoff L, Knoop A, Jensen MB, Ewertz M. Persistence of docetaxel-induced neuropathy and impact on quality of life among breast cancer survivors. *Eur J Cancer* 2015;51(3):292-300.
- [15] Eckhoff L, Nielsen M, Moeller S, Knoop A. TAXTOX - a retrospective study regarding the side effects of docetaxel given as part of the adjuvant treatment to patients with primary breast cancer in Denmark from 2007 to 2009. *Acta Oncol* 2011;50(7):1075-1082.
- [16] Engel DF, de Oliveira J, Lieberknecht V, Rodrigues ALS, de Bem AF, Gabilan NH. Duloxetine Protects Human Neuroblastoma Cells from Oxidative Stress-Induced Cell Death Through Akt/Nrf-2/HO-1 Pathway. *Neurochem Res* 2018;43(2):387-396.
- [17] Fabi A, Papaldo P, Pino MS, Ferretti G, Carlini P, Pacetti U, Di Cosimo S, Nardoni C, Giannarelli D, Sacchi I, Cognetti F. Epirubicin plus docetaxel in metastatic breast cancer: escalating dose does not improve efficacy. A phase II study. *Anticancer Res* 2004;24(3b):1963-1967.
- [18] Goble S, Bear HD. Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions. *Surg Clin North Am* 2003;83(4):943-971.
- [19] Gornstein E, Schwarz TL. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* 2014;76 Pt A:175-183.
- [20] Grisold W, Cavaletti G, Windebank AJ. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro Oncol* 2012;14 Suppl 4:iv45-54.
- [21] Hainsworth JD, Yardley DA, Spigel DR, Meluch AA, Rinaldi D, Schnell FM, Greco FA. Docetaxel and epirubicin as first-line treatment for patients with metastatic breast cancer: a Minnie Pearl Cancer Research Network Phase II trial. *Cancer Invest* 2006;24(5):469-473.
- [22] Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Cooper MR, Hayes DF, Tkaczuk KH, Fleming G, Holland JF, Duggan DB, Carpenter JT, Frei E, 3rd, Schilsky RL, Wood WC, Muss HB, Norton L. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(6):976-983.
- [23] Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Gavin P, Lavino A, Lustberg MB, Paice J, Schneider B, Smith ML, Smith T, Terstriep S, Wagner-Johnston N, Bak K, Loprinzi CL, American Society of Clinical O. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2014;32(18):1941-1967.
- [24] Hughes S, Lacasse J, Fuller RR, Spaulding-Givens J. Adverse effects and treatment satisfaction among online users of four antidepressants. *Psychiatry Res* 2017;255:78-86.
- [25] Irwin RW, Solinsky CM, Brinton RD. Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Front Cell Neurosci* 2014;8:203.

- [26] Ito S, Suto T, Saito S, Obata H. Repeated Administration of Duloxetine Suppresses Neuropathic Pain by Accumulating Effects of Noradrenaline in the Spinal Cord. *Anesth Analg* 2018;126(1):298-307.
- [27] Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(9):671-682.
- [28] Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 2016;594(13):3521-3531.
- [29] Johnson C, Pankratz VS, Velazquez AI, Aakre JA, Loprinzi CL, Staff NP, Windebank AJ, Yang P. Candidate pathway-based genetic association study of platinum and platinum-taxane related toxicity in a cohort of primary lung cancer patients. *J Neurol Sci* 2015;349(1-2):124-128.
- [30] Karout M, Miesch M, Geoffroy P, Kraft S, Hofmann HD, Mensah-Nyagan AG, Kirsch M. Novel analogs of allopregnanolone show improved efficiency and specificity in neuroprotection and stimulation of proliferation. *J Neurochem* 2016;139(5):782-794.
- [31] Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Costa SD, Beuzebec P, Untch M, Blohmer JU, Sinn HP, Sittrek R, Souchon R, Tulusan AH, Volm T, Senn HJ. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J Clin Oncol* 2003;21(13):2600-2608.
- [32] Kim JH, Dougherty PM, Abdi S. Basic science and clinical management of painful and non-painful chemotherapy-related neuropathy. *Gynecol Oncol* 2015;136(3):453-459.
- [33] Lees JG, Makker PG, Tonkin RS, Abdulla M, Park SB, Goldstein D, Moalem-Taylor G. Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Eur J Cancer* 2017;73:22-29.
- [34] Lejri I, Grimm A, Miesch M, Geoffroy P, Eckert A, Mensah-Nyagan AG. Allopregnanolone and its analog BR 297 rescue neuronal cells from oxidative stress-induced death through bioenergetic improvement. *Biochim Biophys Acta* 2017;1863(3):631-642.
- [35] Liu FY, Sun YN, Wang FT, Li Q, Su L, Zhao ZF, Meng XL, Zhao H, Wu X, Sun Q, Xing GG, Wan Y. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Res* 2012;1427:65-77.
- [36] Liu XJ, Zhang Y, Liu T, Xu ZZ, Park CK, Berta T, Jiang D, Ji RR. Nociceptive neurons regulate innate and adaptive immunity and neuropathic pain through MyD88 adapter. *Cell Res* 2014;24(11):1374-1377.
- [37] Lombardi D, Scalone S, Crivellari D, Magri MD, La Mura N, Miolo G, Murrone A, Perin T, Coran F, Candiani E, Massarut S, Veronesi A. Epirubicin and docetaxel as neoadjuvant treatment of locally advanced breast cancer: a phase II study. *Tumori* 2010;96(2):229-233.
- [38] Lunn MP, Hughes RA, Wiffen PJ. Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia. *Cochrane Database Syst Rev* 2014(1):CD007115.
- [39] Majithia N, Temkin SM, Ruddy KJ, Beutler AS, Hershman DL, Loprinzi CL. National Cancer Institute-supported chemotherapy-induced peripheral neuropathy trials: outcomes and lessons. *Support Care Cancer* 2016;24(3):1439-1447.
- [40] Makker PG, Duffy SS, Lees JG, Perera CJ, Tonkin RS, Butovsky O, Park SB, Goldstein D, Moalem-Taylor G. Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *PLoS One* 2017;12(1):e0170814.
- [41] McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* 2009;8(1):10-16.
- [42] Melcangi RC, Garcia-Segura LM, Mensah-Nyagan AG. Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(5):777-797.
- [43] Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 1999;51(1):63-81.
- [44] Meyer L, Patte-Mensah C, Taleb O, Mensah-Nyagan AG. Cellular and functional evidence for a protective action of neurosteroids against vincristine chemotherapy-induced painful neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(17):3017-3034.

- [45] Meyer L, Patte-Mensah C, Taleb O, Mensah-Nyagan AG. Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: multi-parametric assessment and direct evidence. *Pain* 2011;152(1):170-181.
- [46] Meyer L, Patte-Mensah C, Taleb O, Mensah-Nyagan AG. Neurosteroid 3alpha-androstanediol efficiently counteracts paclitaxel-induced peripheral neuropathy and painful symptoms. *PLoS One* 2013;8(11):e80915.
- [47] Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(1):23-36.
- [48] Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 2006;51(2):240-264.
- [49] Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1495-1504.
- [50] Namgung U. The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs* 2014;200(1):6-12.
- [51] Noorbakhsh F, Baker GB, Power C. Allopregnanolone and neuroinflammation: a focus on multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci* 2014;8:134.
- [52] Onutu AH. Duloxetine, an antidepressant with analgesic properties - a preliminary analysis. *Rom J Anaesth Intensive Care* 2015;22(2):123-128.
- [53] Pachman DR, Watson JC, Lustberg MB, Wagner-Johnston ND, Chan A, Broadfield L, Cheung YT, Steer C, Storey DJ, Chandwani KD, Paice J, Jean-Pierre P, Oh J, Kamath J, Fallon M, Strik H, Koeppen S, Loprinzi CL. Management options for established chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Support Care Cancer* 2014;22(8):2281-2295.
- [54] Park SB, Goldstein D, Krishnan AV, Lin CS, Friedlander ML, Cassidy J, Koltzenburg M, Kiernan MC. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. *CA Cancer J Clin* 2013;63(6):419-437.
- [55] Patte-Mensah C, Kibaly C, Boudard D, Schaeffer V, Begle A, Saredi S, Meyer L, Mensah-Nyagan AG. Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci* 2006;28(1):17-31.
- [56] Patte-Mensah C, Meyer L, Taleb O, Mensah-Nyagan AG. Potential role of allopregnanolone for a safe and effective therapy of neuropathic pain. *Prog Neurobiol* 2014;113:70-78.
- [57] Perahia DG, Kajdasz DK, Desai D, Haddad PM. Symptoms following abrupt discontinuation of duloxetine treatment in patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 2005;89(1-3):207-212.
- [58] Pereira S, Fontes F, Sonin T, Dias T, Fragoso M, Castro-Lopes JM, Lunet N. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy after neoadjuvant or adjuvant treatment of breast cancer: a prospective cohort study. *Support Care Cancer* 2016;24(4):1571-1581.
- [59] Reddy DS. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* 2010;186:113-137.
- [60] Reinisch M, von Minckwitz G, Harbeck N, Janni W, Kummel S, Kaufmann M, Elling D, Nekljudova V, Loibl S. Side effects of standard adjuvant and neoadjuvant chemotherapy regimens according to age groups in primary breast cancer. *Breast Care (Basel)* 2013;8(1):60-66.
- [61] Rouzier R, Mathieu MC, Sideris L, Youmsi E, Rajan R, Garbay JR, Andre F, Marsiglia H, Spielmann M, Delaloge S. Breast-conserving surgery after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy for large breast tumors. *Cancer* 2004;101(5):918-925.
- [62] Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 2014;155(12):2461-2470.
- [63] Sinha BK, Politi PM. Anthracyclines. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 1990;11:45-57.
- [64] Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, Bressler LR, Fadul CE, Knox C, Le-Lindqwister N, Gilman PB, Shapiro CL, Alliance for Clinical Trials in O. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013;309(13):1359-1367.

- [65] Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci* 2017;10:174.
- [66] Taleb O, Bouzobra F, Tekin-Pala H, Meyer L, Mensah-Nyagan AG, Patte-Mensah C. Behavioral and electromyographic assessment of oxaliplatin-induced motor dysfunctions: Evidence for a therapeutic effect of allopregnanolone. *Behav Brain Res* 2017;320:440-449.
- [67] Taleb O, Patte-Mensah C, Meyer L, Kemmel V, Geoffroy P, Miesch M, Mensah-Nyagan AG. Evidence for effective structure-based neuromodulatory effects of new analogues of neurosteroid allopregnanolone. *J Neuroendocrinol* 2018;30(2).
- [68] Teshome M, Hunt KK. Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2014;23(3):505-523.
- [69] Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 2002;22(15):6696-6703.
- [70] Trudeau ME, Chapman JA, Guo B, Clemons MJ, Dent RA, Jong RA, Kahn HJ, Pritchard KI, Han L, O'Brien P, Shepherd LE, Parissenti AM. A phase I/II trial of epirubicin and docetaxel in locally advanced breast cancer (LABC) on 2-weekly or 3-weekly schedules: NCIC CTG MA.22. *Springerplus* 2015;4:631.
- [71] Vacca V, Marinelli S, Pieroni L, Urbani A, Luvisetto S, Pavone F. Higher pain perception and lack of recovery from neuropathic pain in females: a behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice. *Pain* 2014;155(2):388-402.
- [72] Van de Wiel M, Dockx Y, Van den Wyngaert T, Stroobants S, Tjalma WAA, Huizing MT. Neoadjuvant systemic therapy in breast cancer: Challenges and uncertainties. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;210:144-156.
- [73] Wang JM, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J Neurosci* 2005;25(19):4706-4718.
- [74] Wang XM, Lehky TJ, Brell JM, Dorsey SG. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Cytokine* 2012;59(1):3-9.
- [75] Warwick RA, Hanani M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain* 2013;17(4):571-580.
- [76] Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001(30):96-102.
- [77] Yang YH, Lin JK, Chen WS, Lin TC, Yang SH, Jiang JK, Chang SC, Lan YT, Lin CC, Yen CC, Tzeng CH, Wang WS, Chiang HL, Teng CJ, Teng HW. Duloxetine improves oxaliplatin-induced neuropathy in patients with colorectal cancer: an open-label pilot study. *Support Care Cancer* 2012;20(7):1491-1497.
- [78] Zhang H, Li Y, de Carvalho-Barbosa M, Kavelaars A, Heijnen CJ, Albrecht PJ, Dougherty PM. Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *J Pain* 2016;17(7):775-786.

Figure legends

Figure 1. Time-course of mechanical allodynia (A) and hyperalgesia (B, C) induced by (EPI+DO)-NAC treatment. Graphs show the mean (+ SEM) of the percentage of paw withdrawal responses to mechanical stimulation by von Frey filament 4 (A), 15 (B) or 26 g (C) (n=6 animals per group). (D) Effects of NAC treatment on rat cold thermal nociception assessed by acetone test. Each point represents the mean (+ SEM) of 6 observations in each of the 6 rats. Statistical differences between control and c-veh group for each testing day are shown. Multiple t-test; * $p < 0.05$.

Figure 2. Nerve action potential parameters determined from sciatic nerves dissected from control (veh-veh) or (EPI+DO)-NAC-treated (c-veh) animals. Histograms show statistical data for NAP maximal peak amplitude (A) and conduction velocity (B) parameters (n = 4 to 6 rats per group). t-test; ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Figure 3. Assessment of protein NF200 immunoreactivity (A, B) and expression level (C, D). (A) Photomicrographs of NF200 immunofluorescence in rat sagittal sections of sciatic nerve dissected from vehicle (veh-veh) or (EPI+DO)-NAC (c-veh) treated rats (scale bar 20 μm). Nerve sections were labeled with the monoclonal NF200 antibody revealed with Alexa-488-conjugated goat anti-mouse. (B) Comparative analysis of the mean intensity of NF200 detected in sciatic nerve sections. Each value is expressed as percent (+ SEM) of NF200 fluorescence intensity detected in vehicle treated rats (n=6 rats per group). (C) Typical western blot of sciatic nerve protein extract obtained from control (veh-veh) or NAC (c-veh) treated animals and (D) histogram of normalized mean (+ SEM) values. α -tubuline (α -tub) was used as a loading control. t-test; ** $p < 0.005$.

Figure 4. Protective effects of DU, AP and DUAP against (EPI+DO)-NAC-induced neuropathic pain symptoms. Chart bars show the mean (+ SEM, n = 6) of the percentage of paw withdrawal responses to mechanical stimulation by von Frey filament 4 (A) or 26 g (B) and 6 observations per rat in the acetone test (C). Protection by DU, AP or DUAP against NAC-induced mechanical allodynia (A),

hyperalgesia (B) and cold-allodynia (C). Statistical differences between c-veh group and the other groups are given.

Two-way ANOVA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure 5. DU, AP or DUAP protection against (EPI+DO)-NAC-induced alterations of sciatic nerve action potential parameters. NAP peak amplitude (A) and conduction velocity (B) of ex vivo sciatic nerve measured at the end of the various treatments. Each value is expressed as percent (+ SEM) of values obtained in vehicle treated rats ($n = 4$ to 6 rats per group). Statistical differences for comparison with the c-veh group are shown.

One-way ANOVA; ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Figure 6. DU, AP and DUAP protection against (EPI+DO)-NAC-induced NF200 decrease. Assessment of protein NF200 immunoreactivity (A and B) and expression level (C and D). (A) shows representative photomicrographs of NF200 immunofluorescence in rat sagittal sections of sciatic nerve dissected from each treated-rat group (scale bar 20 μm). Statistical data of the mean intensity of NF200 detected in sciatic nerve sections are given in B. (C) Representative western blot of NF200 in protein extract from sciatic nerve dissected from the different animal groups and histogram of normalized mean (+SEM) data (D). Statistical differences for comparison with the c-veh group are given.

One-way ANOVA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

α -tub: α -tubuline

Figure 7. (A-E) Representative fluorescent images of cell nuclei stained by 4',6-dianidino-2-phenylindole (DAPI) in sciatic nerves of control (veh-veh), (EPI+DO)-NAC+vehicle-treated (c-veh) or (EPI+DO)-NAC+DUAP-treated (c-veh-DUAP) rats (scale bar 20 μm). (F) Histogram shows the relative density of DAPI stained nuclei per surface unit (SU). Results are expressed as percent of control. Statistical differences for comparison with control group are shown.

One-way ANOVA; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$.

Figure 8. (A-E) Representative immunofluorescent images of CD11b/c-positive cells (macrophages) detected in sciatic nerves of control (veh-veh), (EPI+DO)-NAC+vehicle-treated (c-veh) or (EPI+DO)-

NAC+DUAP-treated (c-veh-DUAP) rats (scale bar 20µm). (F) Illustration of the enlargement of the CD11b/c positive-cell framed in red on image C (scale bar 5µm). (G) Histogram shows the number of CD11b/c positive-cells counted by mm². Statistical differences for comparison with control group are shown.

One-way ANOVA; ****p<0.0001 compared to veh-veh group; ## p<0.005, ##### p<0.0001.

Figure 9. (A-E) Representative immunofluorescent images of glial fibrillary acid protein (GFAP) stained in sciatic nerves of control (veh-veh), (EPI+DO)-NAC+vehicle-treated (c-veh) or (EPI+DO)-NAC+DUAP-treated (c-veh-DUAP) rats (scale bar 20µm). (F) Histogram shows the relative density of GFAP stained nuclei per surface unit (SU). Results are expressed as percent of control. Statistical differences for comparison with c-veh group are shown.

One-way ANOVA; *p<0.05, **p<0.005.

Table legends

Table 1. Distribution of symptom severity per animal experimental groups for mechanical allodynia (A), mechanical hyperalgesia (B) and cold thermal allodynia (C). Grades 0 to 4 respectively represent the absence, 25, 50, 75 or 100% of the maximal symptom severity observed for allodynia or hyperalgesia.

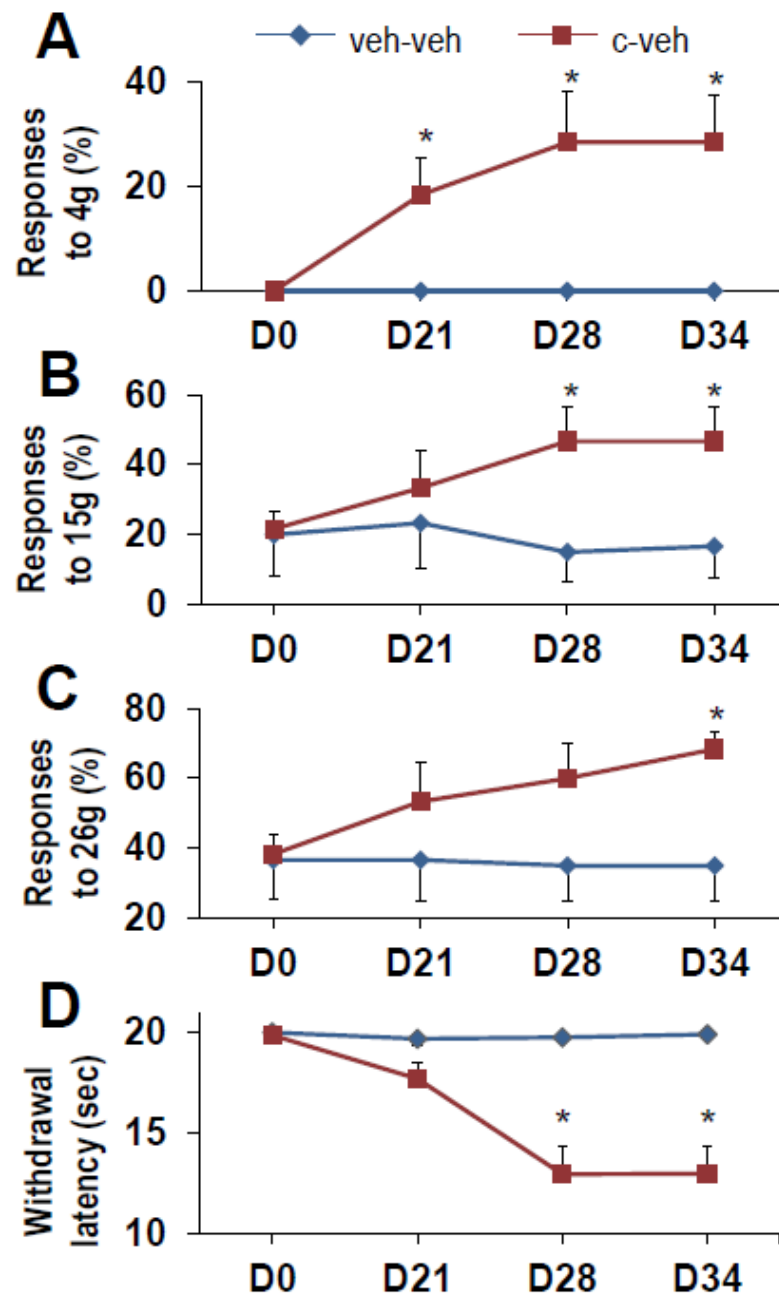
Figure 1

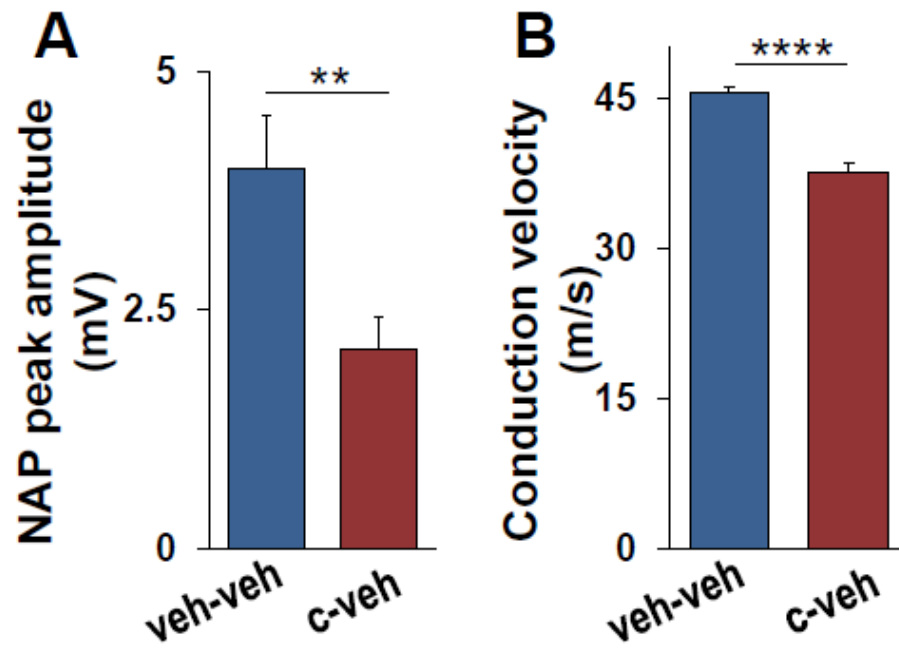
Figure 2

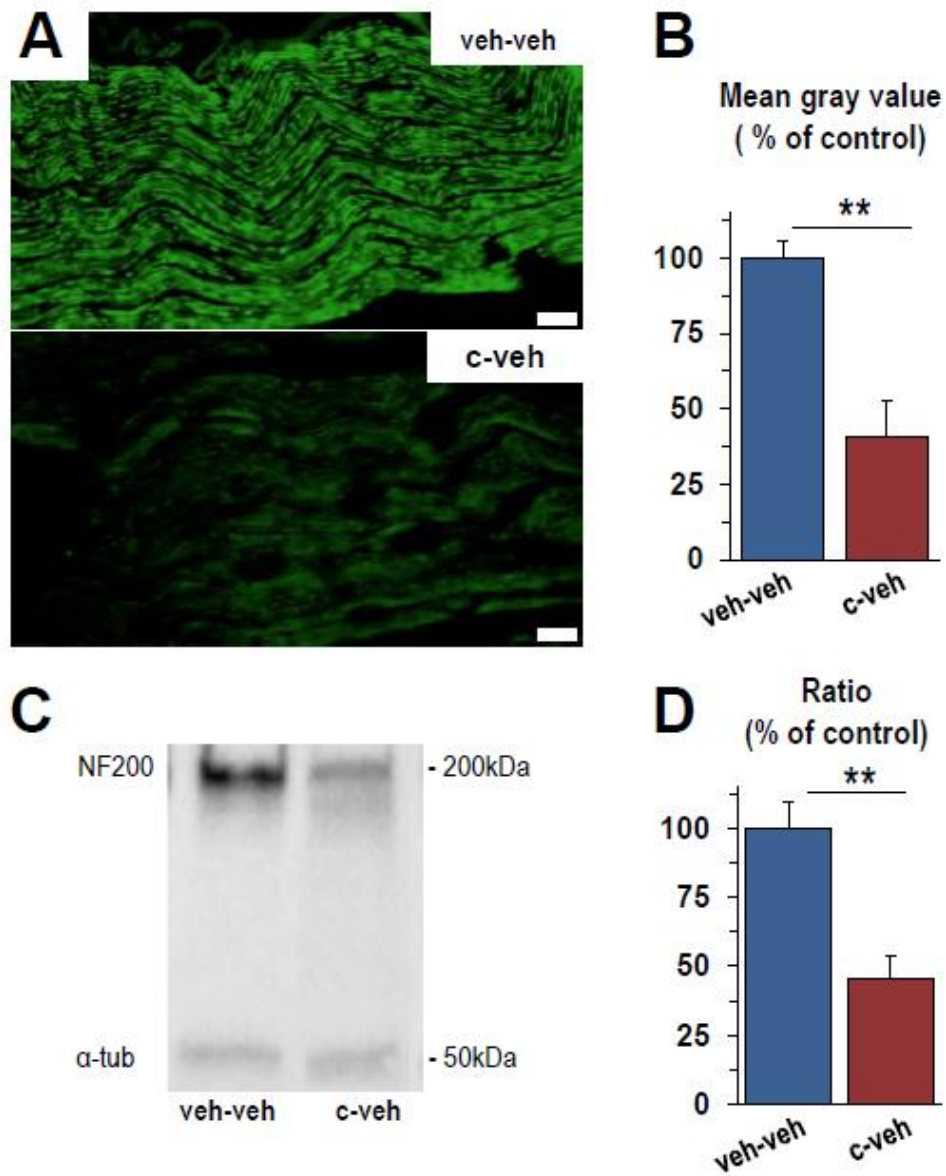
Figure 3

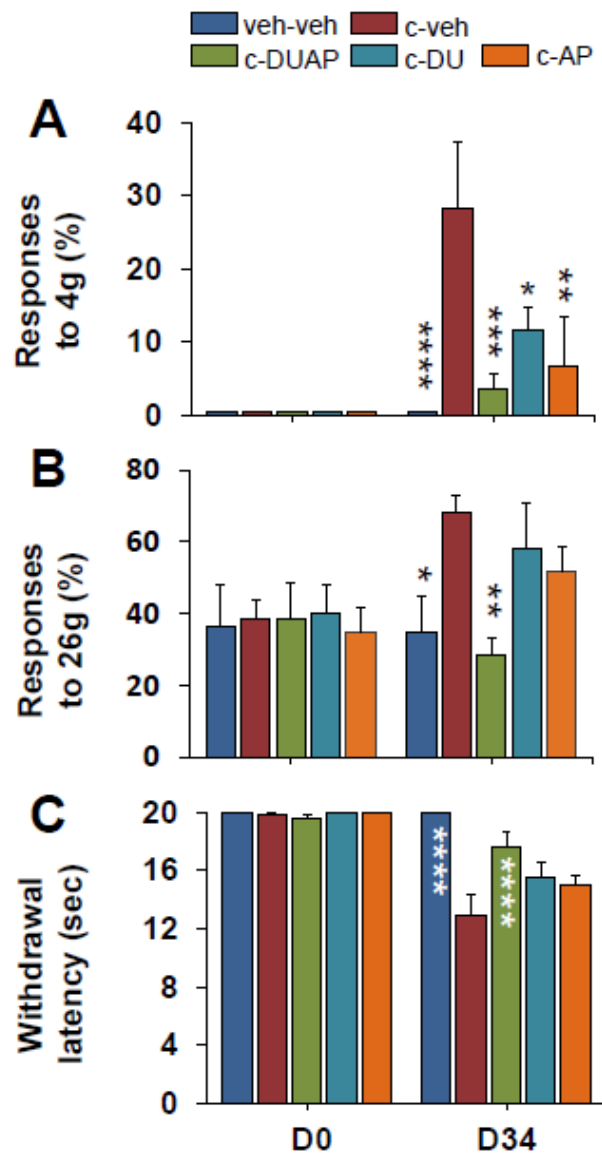
Figure 4

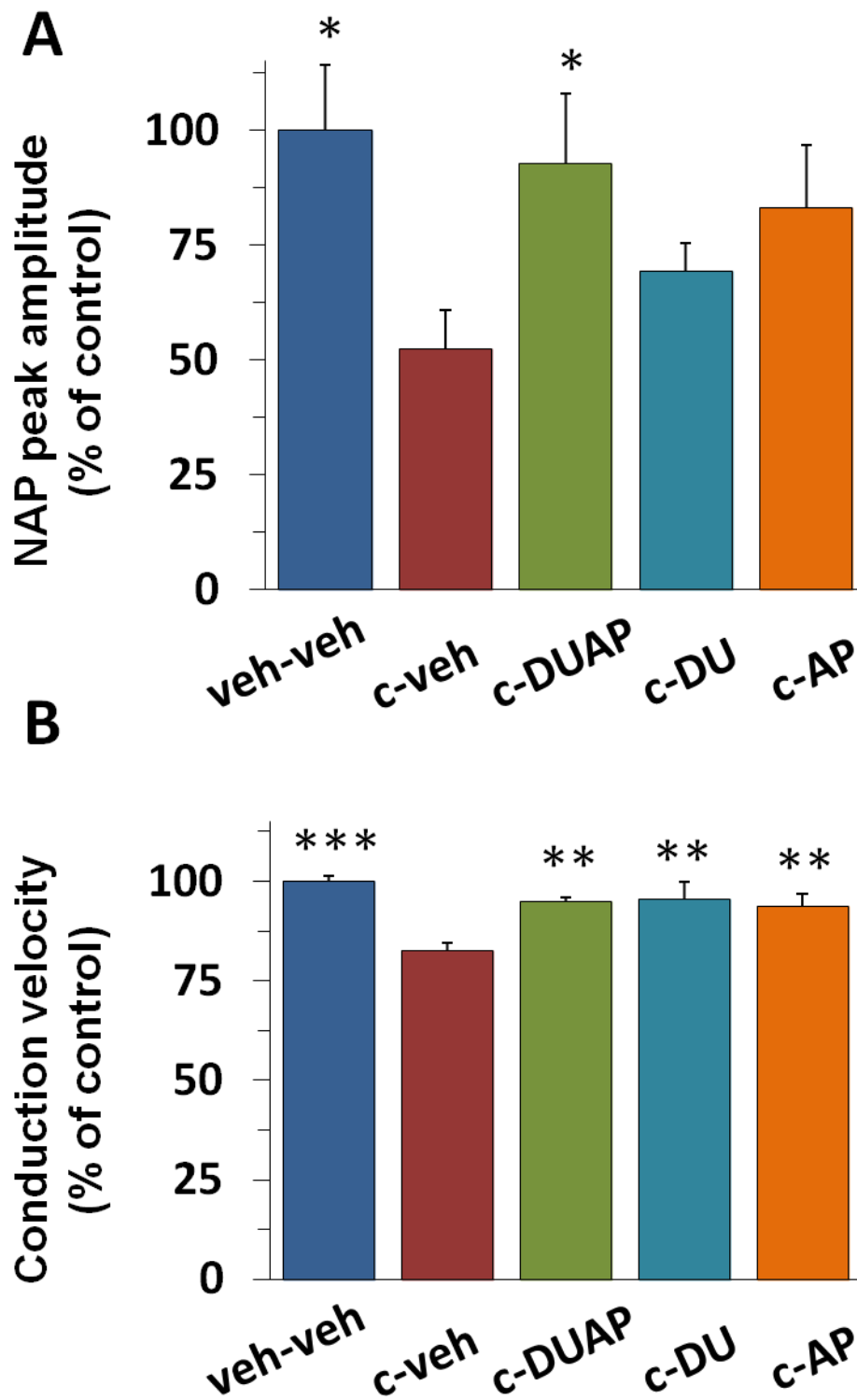
Figure 5

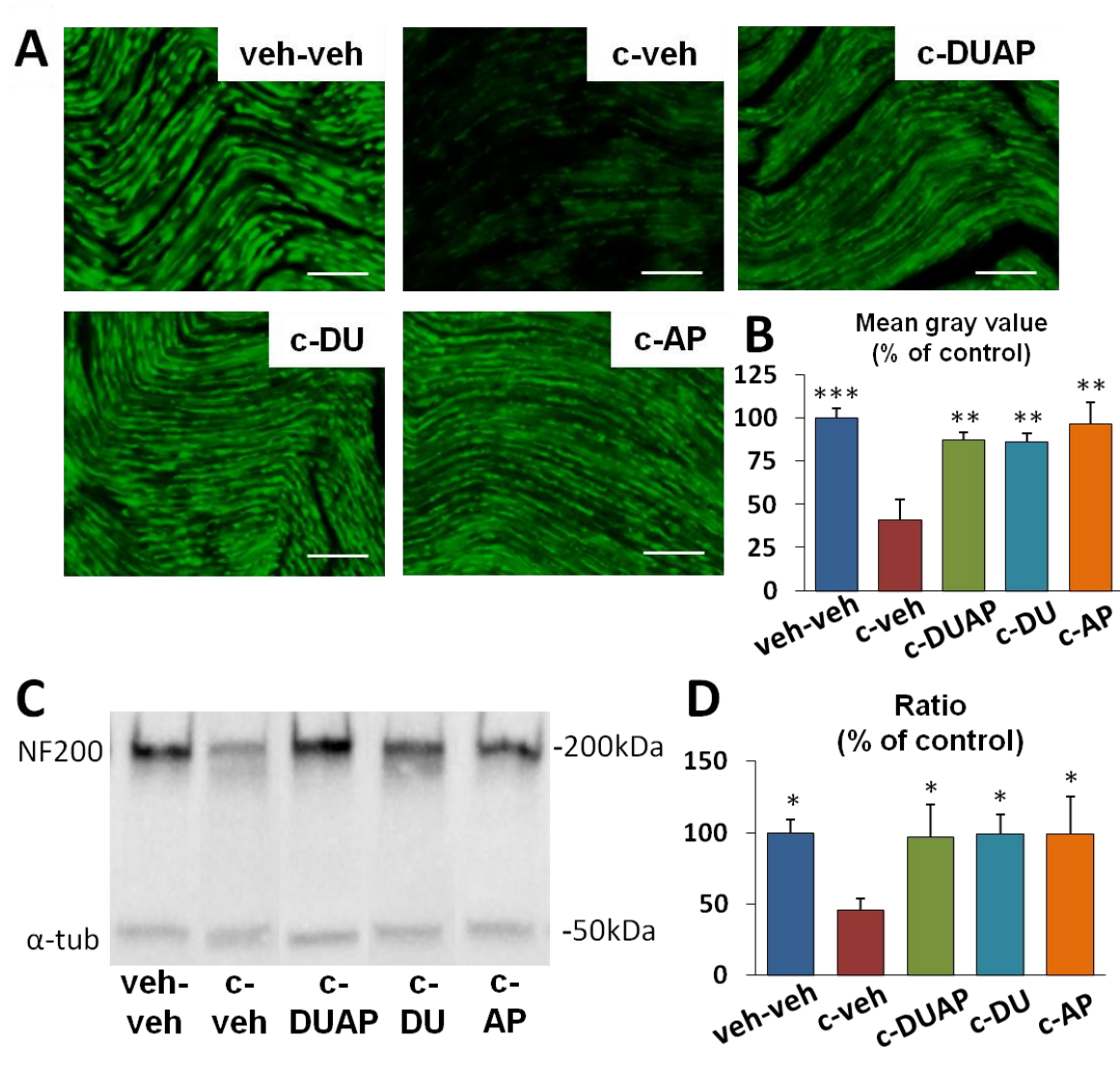
Figure 6

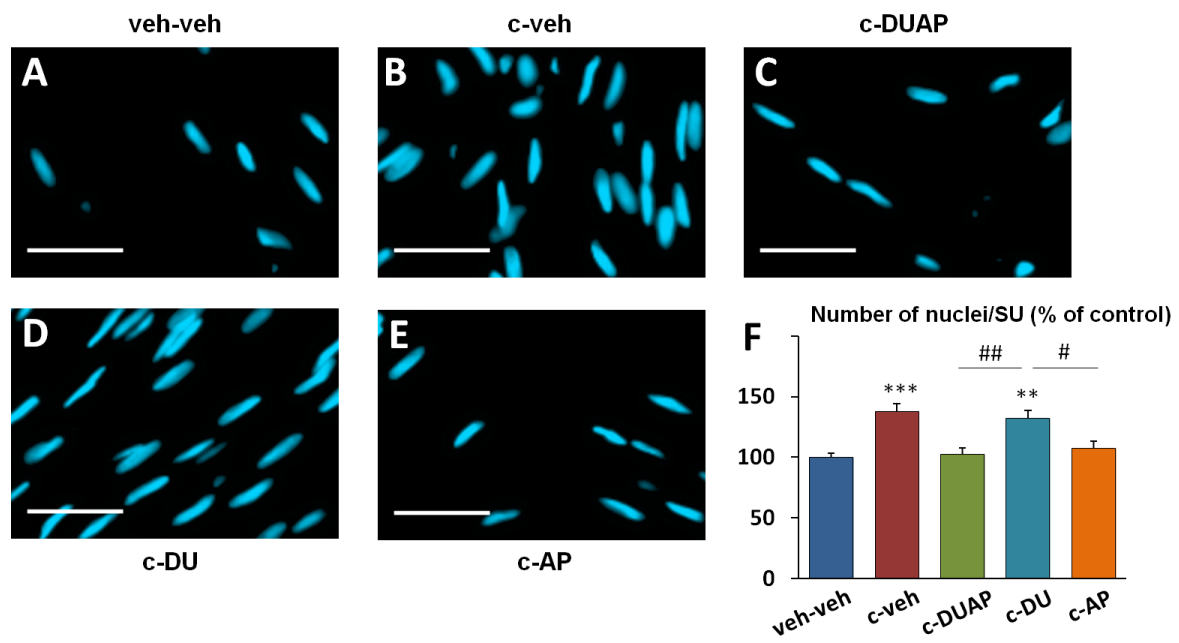
Figure 7

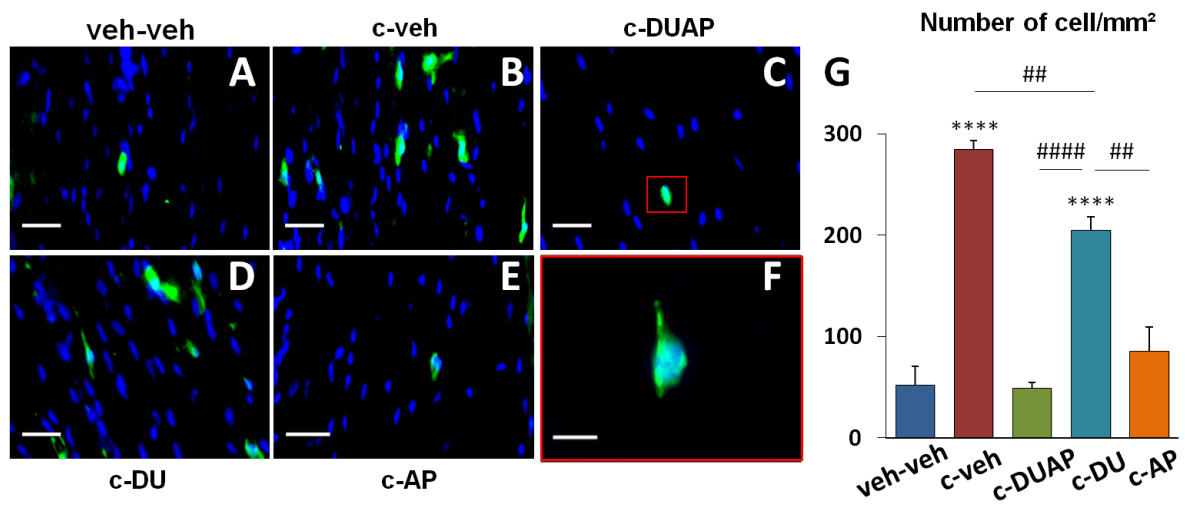
Figure 8

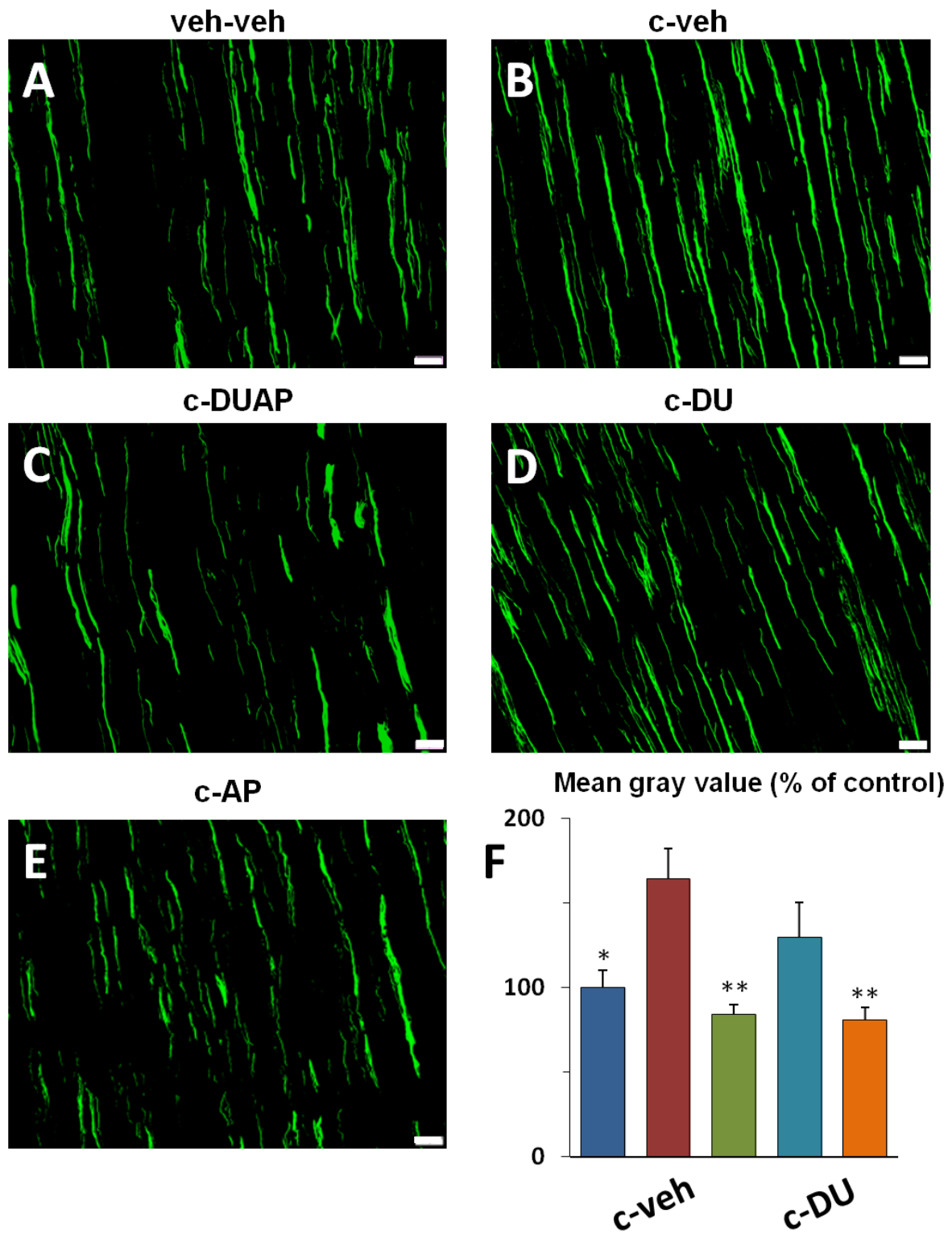
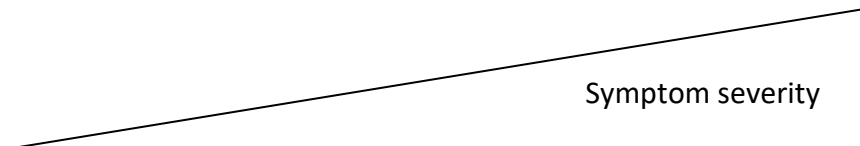
Figure 9

Table 1**A**

	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
veh-veh	100%	-	-	-	-
c-veh	-	50%	17%	-	33%
c-DUAP	67%	33%	-	-	-
c-DU	17%	50%	33%	-	-
c-AP	83%	-	-	17%	-

B

	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
veh-veh	100%	-	-	-	-
c-veh	-	17%	17%	66%	-
c-DUAP	100%	-	-	-	-
c-DU	33%	-	50%	-	17%
c-AP	17%	33%	50%	-	-

C

	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
veh-veh	100%	-	-	-	-
c-veh	-	-	50%	17%	33%
c-DUAP	33%	50%	-	17%	-
c-DU	-	33%	50%	17%	-
c-AP	-	17%	66%	17%	-

Neuropathies induites par chimiothérapie néo-adjuvante du cancer du sein : atteintes périphériques et centrales, mécanismes impliqués et perspectives thérapeutiques

Résumé

La chimiothérapie néoadjuvante (CNA) est une avancée majeure dans les traitements des cancers du sein. La CNA réduit nettement la tumeur primaire et permet une chirurgie conservatrice à tous les stades du cancer. Malheureusement, elle s'accompagne de dysfonctionnements neurologiques qui limitent le succès du traitement anti-tumoral. La prise en charge médicale de ces troubles neurologiques est problématique compte tenu de l'inefficacité des neuroprotecteurs disponibles. De plus, la recherche de nouvelles thérapeutiques est handicapée par l'absence de modèles expérimentaux reproduisant fidèlement les symptômes évoqués par la CNA séquentielle « épirubicine (EPI)/docétaxel (DO) » ou CNA-[EPI-DO] fréquemment utilisée.

Ce travail de thèse a permis de caractériser pour la première fois un modèle animal pertinent de troubles neurologiques périphériques et centraux évoqués par la CNA-[EPI-DO]. Ce modèle préclinique a été utilisé pour révéler l'efficacité d'un traitement concomitant de duloxétine et d'allopregnanolone contre la neuropathie périphérique douloureuse induite par la CNA-[EPI-DO]. Nos travaux montrent aussi que la duloxétine exerce une action bénéfique contre les déficits cognitifs évoqués par la CNA-[EPI-DO]. La thèse ouvre des perspectives prometteuses à explorer pour le développement de thérapies efficaces contre les altérations neurologiques CNA-induites.

Mots clés : Allopregnanolone ; Chimiothérapie néo-adjuvante ; Duloxétine ; Neuropathie périphérique chimio-induite ; Neuroprotection ; Troubles cognitifs chimio-induits

Abstract

Neoadjuvant chemotherapy (NAC) represents a major progress in breast cancer therapy. By shrinking significantly, the tumor volume, NAC allows conservative surgery at all stages of breast cancer. Unfortunately, NAC also induces neurological dysfunctions that jeopardize the chances of success of anti-tumor treatments. Therapeutic management of these neurological disorders remains a major concern because neuroprotective drugs currently available are not effective. Furthermore, investigations to characterize novel effective therapeutics are hampered by the lack of reliable experimental models mimicking the neurological symptoms evoked by the sequential epirubicin (EPI)/docetaxel (DO)-NAC or [EPI-DO]-NAC frequently used in humans.

The present thesis work allowed the first characterization of a relevant animal model of [EPI-DO]-NAC-induced peripheral and central neurological disorders. This preclinical model has successfully been used to demonstrate the efficacy of duloxetine and allopregnanolone concomitant treatment against [EPI-DO]-NAC-evoked painful peripheral neuropathy. Our results also reveal a beneficial action of duloxetine against [EPI-DO]-NAC-induced cognitive deficits. The thesis opens promising perspectives to be explored for the development of effective therapies against [EPI-DO]-NAC-induced neurological alterations.

Key words: Allopregnanolone; Neoadjuvant chemotherapy; Duloxetine; Chemotherapy-induced peripheral neuropathy; Neuroprotection; Chemo-induced cognitive disorders