

Université de Montréal

**Métriologie de la douleur animale sur modèles expérimentaux :  
développement et validation de biomarqueurs neuroprotéomiques.**

par Colombe Otis

Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor* (Ph. D.)  
en sciences vétérinaires option pharmacologie

Août, 2017

© Colombe Otis, 2017

## Résumé

La douleur est un phénomène complexe et dynamique comprenant un processus primaire et sensoriel, la nociception, auquel se rajoutent des réactions de défense et d'alarme psychophysiologiques. Ceci conduit au développement d'une véritable mémoire de la douleur, individuelle et modulée (plasticité neuronale) par des expériences précédentes de douleur, incluant entre autres, des phénomènes de sensibilisation nociceptive. Pour bien comprendre les mécanismes de sensibilisation centrale, les modèles animaux mimant les pathologies humaines sont d'une importance primordiale.

Or, pour ce faire, nous avons proposé une série d'approches expérimentales translationnelles par le développement de modèles expérimentaux de douleur bovine, canine et murine afin de caractériser les atteintes du protéome spinal en fonction du niveau de douleur perçu par l'animal et d'identifier le (les) marqueur (s) potentiellement modulé (s) par la sensibilisation nociceptive.

À l'aide de la neuroprotéomique, nous avons identifié sur un modèle bovin de douleur viscérale, la protéine transthyrétine (TTR) comme étant sous-exprimée dans le protéome spinal en présence de douleur et ce, vérifié également dans le modèle canin de douleur chronique liée à l'arthrose chirurgicale. Ces résultats suggèrent la possibilité d'entrevoir la TTR comme un biomarqueur potentiel de la douleur chronique. Notre découverte de la relation entre les niveaux spinaux de TTR par neuroprotéomique et l'hypersensibilité à la douleur dans les modèles bovin et canin soutiennent l'implication de composantes inflammatoires nociceptives et immunitaires.

Par la suite, des procédures de validation métrologique des protocoles d'acclimatation et de conditions environnementales de manipulations ont permis d'identifier les méthodes d'évaluation de la douleur les plus fiables et sensibles.

Le modèle d'induction de douleur arthrosique induite chimiquement (injection intra-articulaire de monosodium iodoacétate) chez le rat a ensuite démontré qu'une augmentation de l'expression temporelle des neuropeptides spinaux excitateurs tels que la substance P, le peptide relié au gène de la calcitonine, la bradykinine et celle du peptide inhibiteur somatostatine, supportaient le phénomène de sensibilisation centrale dans ce modèle, tout comme les évaluations fonctionnelles. Les différences observées entre les analgésiques sur les résultats

fonctionnels ont été étayées par différentes influences sur les concentrations des neuropeptides spinaux, permettant ainsi d'augmenter la validité ainsi que la sensibilité des méthodes d'évaluation algésimétrique et biomécaniques de la douleur.

Afin de développer un modèle expérimental de douleur chronique imitant plus étroitement la progression post-traumatique de l'arthrose, un modèle chirurgical a montré la possibilité d'induire des changements compatibles avec de la douleur pathologique chronique. Le modèle chirurgical d'induction de douleur arthrosique a induit des changements neurophysiologiques quantifiables associés à la sensibilisation centrale. Ces modifications des altérations fonctionnelles ont été concomitantes avec la libération de neuropeptides spinaux. La comparaison avec le modèle chimique a montré des modifications plus persistantes et moins agressives qui serait potentiellement utiles pour l'évaluation des modalités thérapeutiques dans l'arthrose.

L'utilisation de la protéomique jumelée avec des méthodes d'évaluation comportementale afin de quantifier la douleur pourrait permettre une gestion complètement nouvelle de la douleur et du bien-être animal.

**Mots-clés :** Biomarqueur, Neuroprotéomique, Sensibilisation centrale, Douleur, Modèle animal, Neuropeptide, Métrologie de la douleur, Validation.

## **Abstract**

Pain is a complex and dynamic phenomenon including a primary and sensory process, nociception, to which are added psychophysiological defense and alarm reactions. This leads to the development of a true memory of pain, individual and modulated (neuronal plasticity) by previous experiences of pain, including nociceptive sensitivity. Animal models mimicking human pathologies are crucial to understand the mechanisms of central sensitization.

We proposed a series of translational experimental approaches by developing experimental models of bovine, canine and murine pain in order to characterize spinal proteome modifications according to the level of pain perceived by the animal and consequently, to identify the biomarkers (s) potentially modulated by nociceptive sensitization.

By using a neuroproteomic method, in a bovine model of visceral pain, the transthyretin (TTR) protein was identified and down-regulated in the spinal proteome in the presence of pain, and this was verified in a canine model of chronic pain related to surgical osteoarthritis (OA) induction. These findings suggest the possibility of considering TTR as a potential biomarker of chronic pain. Our discovery of the relationship between spinal levels of TTR by neuroproteomic and pain hypersensitivity in bovine and canine models supports the involvement of inflammatory, nociceptive and immune components.

Subsequently, procedures for metrological validation of acclimatization protocols and environmental conditions of manipulation have identified the most reliable and sensitive methods of pain assessment.

The chemical model (intraarticular injection of monosodium iodoacetate) of chronic pain induction related to OA in rats also allowed us to demonstrate that an increase in the temporal expression of excitatory spinal neuropeptides such as substance P, calcitonin gene-related peptide, bradykinin and the anti-nociceptive somatostatin, is associated with central sensitization phenomenon in this model, as also supported by functional evaluations. The differences observed on functional results between the analgesic drugs were supported by different influences on spinal neuropeptide concentrations, thus increasing the validity and psychometric sensitivity of quantitative sensory testing and biomechanical pain assessment methods.



In the aim to elaborate an experimental model of chronic pain related to OA reproducing more closely post-traumatic progression, the development of a surgical model in rodent has shown the possibility of inducing changes compatible with chronic pathological pain. The surgical model of OA pain induction generated quantifiable neurophysiological changes associated with central sensitization. These changes in functional alterations were concomitant with the release of spinal neuropeptides. The comparison with the chemical model showed more persistent and less aggressive modifications which would be potentially useful for the evaluation of therapeutic modalities in OA.

The use of objective proteomic methods combined with subjective evaluation to quantify pain could lead to a completely new management of pain and animal welfare.

**Keywords :** Biomarker, Neuroproteomic, Central sensitization, Pain, Animal model, Neuropeptide, Pain metrology, Validation.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xix
Liste des figures.....	xxi
Liste des sigles et abréviations.....	xxiv
Remerciements.....	xxxiii
Introduction.....	1
1. Recension de la littérature.....	3
1.1 La douleur.....	3
1.1.1 Les bases neurophysiologiques de la douleur.....	4
1.1.1.1 De la périphérie à la moelle épinière.....	6
1.1.1.1.1 Au niveau périphérique.....	7
1.1.1.1.2 Au niveau spinal.....	9
1.1.1.1.3 De la moelle épinière au cerveau.....	11
1.1.2 Les mécanismes de modulation de la douleur.....	12
1.1.2.1 Modulations inhibitrices.....	13
1.1.2.1.1 Au niveau spinal (théorie du portillon).....	13
1.1.2.1.2 Les contrôles inhibiteurs descendants.....	13
1.1.2.1.3 Au niveau des centres supérieurs du système nerveux central.....	14
1.1.2.2 Les contrôles facilitateurs descendants.....	15
1.1.3 Les différents types de douleurs.....	16
1.1.3.1 La douleur nociceptive.....	16
1.1.3.1.1 Activation et sensibilisation des nocicepteurs en contexte inflammatoire.....	16
1.1.3.1.2 Sensibilisation centrale et inflammation.....	20
1.1.3.2 La douleur neuropathique.....	23
1.1.3.2.1 Sensibilisation périphérique neuropathique.....	24

1.1.3.2.2 Sensibilisation centrale et douleur neuropathique .....	26
1.1.4 Le phénomène de neuroplasticité.....	27
1.1.5 La régulation de la douleur par les cellules non-neuronales.....	28
1.1.5.1 Modulation de la douleur par les cellules non-neuronales : monocytes, macrophages, cellules T et kératinocytes.....	29
1.1.5.2 Les cellules gliales au niveau central.....	30
1.1.5.3 Glie périphérique : cellules de Schwann et cellules satellites gliales .....	33
1.1.5.4 L'implication des récepteurs de type Toll .....	33
1.1.6 Les traitements pharmacologiques de la douleur.....	35
1.2 Les neuropeptides .....	37
1.2.1 Nature chimique.....	37
1.2.2 Métabolisme : biosynthèse, maturation et régulation .....	38
1.2.3 Récepteur des neuropeptides : le récepteur couplé aux protéines G.....	41
1.2.4 La substance P.....	42
1.2.4.1 Biochimie.....	42
1.2.4.2 Pharmacologie.....	43
1.2.4.3 Physiologie.....	44
1.2.5 Le peptide relié au gène de la calcitonine .....	45
1.2.5.1 Biochimie.....	45
1.2.5.2 Pharmacologie.....	45
1.2.5.3 Physiologie.....	46
1.2.6 Les peptides opioïdes.....	47
1.2.6.1 Biochimie.....	47
1.2.6.2 Pharmacologie.....	48
1.2.6.3 Physiologie.....	48
1.2.6.4 L'hyperalgésie morphinique .....	50
1.2.7 La bradykinine .....	51
1.2.7.1 Biochimie.....	51
1.2.7.2 Pharmacologie.....	51
1.2.7.3 Physiologie.....	51
1.2.8 La somatostatine.....	52

1.2.8.1 Biochimie.....	52
1.2.8.2 Pharmacologie.....	53
1.2.8.3 Physiologie.....	53
1.2.9 La transthyrétine .....	54
1.2.9.1 Biochimie.....	54
1.2.9.2 Pharmacologie.....	55
1.2.9.3 Physiologie.....	55
1.3 Biomarqueurs et l'étude des -omiques.....	57
1.3.1 Généralités .....	57
1.3.2 L'identification et la quantification protéique dans la douleur chronique.....	60
1.4 Modèles expérimentaux de la douleur animale .....	62
1.4.1 Généralités .....	62
1.4.2 Les différents modèles de douleur .....	64
1.4.2.1 Modèles expérimentaux de douleur inflammatoire neurogène et articulaire....	65
1.4.2.2 Modèles expérimentaux de douleur neuropathique .....	68
1.4.2.3 Modèles expérimentaux de douleur viscérale.....	69
1.4.3 Facteurs affectant la translation inter-espèce.....	69
1.4.4 Modalités d'évaluation de la douleur.....	71
1.4.4.1 La validité et la fiabilité d'une mesure .....	71
1.4.5 Méthodes de mesures de la douleur.....	73
1.4.5.1 Techniques basées sur la physiologie .....	73
1.4.5.2 Les échelles et les grilles pour évaluer les comportements nociceptifs.....	74
1.4.5.3 Les mesures réflexes.....	75
1.4.5.3.1 Les mesures réflexes mécaniques .....	76
1.4.5.3.1.1 Le Randall-Selitto .....	76
1.4.5.3.1.2 Le von Frey .....	76
1.4.5.3.1.3 Le test d'agrippement .....	77
1.4.5.3.1.4 L'algomètre de pression.....	77
1.4.5.3.2 Les mesures réflexes thermiques .....	77
1.4.5.4 Le test de la sommation temporelle .....	78
1.4.5.5 Le test de la modulation de la douleur conditionnée .....	79

1.4.5.6 Les mesures innées/spontanées.....	80
1.4.5.6.1 Distribution pondérale statique.....	81
1.4.5.6.2 Distribution pondérale dynamique.....	81
1.4.5.6.3 Mesures cinétiques de la démarche.....	82
1.4.5.6.4 Activité motrice spontanée.....	83
1.4.5.7 Les tests opérant.....	83
1.5 La douleur chronique et l'arthrose.....	85
1.5.1 Généralités.....	85
1.5.2 L'articulation du genou sain.....	85
1.5.3 L'articulation du genou arthrosique.....	87
1.5.4 Les molécules médiatrices de la douleur liée à l'arthrose.....	90
1.6 Résumé et énoncé des buts, hypothèses et objectifs de recherche.....	92
2. Publications.....	95
2.1 Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: a pilot, prospective, blinded, randomized and controlled study focusing on spinal pain proteomics.....	95
2.1.1 Abstract.....	96
2.1.2 Keywords.....	97
2.1.3 Introduction.....	97
2.1.4 Materials and methods.....	99
2.1.4.1 Animals.....	99
2.1.4.2 Study Design.....	100
2.1.4.3 Surgically induced traumatic reticuloperitonitis.....	102
2.1.4.4 Rescue Analgesia.....	102
2.1.4.5 Cerebrospinal fluid biomarkers.....	102
2.1.4.5.1 Cerebrospinal fluid proteomic determination.....	103
2.1.4.5.2 Cerebrospinal fluid catecholamine determination.....	103
2.1.4.6 Mechanical pain threshold.....	104
2.1.4.7 Spontaneous behavioral measurements.....	104
2.1.4.7.1 Accelerometry.....	104
2.1.4.7.2 Automated Video-Analysis.....	105

2.1.4.8 Observer-reported pain measures .....	107
2.1.4.9 Physiological and pathological measurements .....	108
2.1.4.10 Data and Statistical Analyses .....	109
2.1.5 Results .....	110
2.1.5.1 Rescue Analgesia .....	110
2.1.5.2 Cerebrospinal biomarkers .....	111
2.1.5.2.1 Cerebrospinal proteomics .....	111
2.1.5.2.2 Cerebrospinal catecholamine .....	113
2.1.5.3 Mechanical pain threshold sensitivity .....	114
2.1.5.4 Spontaneous Behavioral Measurements .....	114
2.1.5.4.1 Accelerometry .....	114
2.1.5.4.2 Automated Video-Analysis .....	116
2.1.5.5 Observer-reported pain measures .....	117
2.1.5.6 Physiological and pathological measurements .....	118
2.1.6 Discussion .....	119
2.1.7 Conclusion .....	125
2.1.8 Acknowledgements .....	125
2.1.9 References .....	125
2.2 Association between sensitisation and pain-related behaviours in an experimental canine model of osteoarthritis .....	131
2.2.1 Abstract .....	132
2.2.2 Keywords .....	133
2.2.3 Introduction .....	133
2.2.4 Materials and methods .....	135
2.2.4.1 Dogs and experimental desing .....	135
2.2.4.2 Anaesthesia and CCLT surgery .....	136
2.2.4.3 Centralised pain evaluation .....	136
2.2.4.3.1 Selected spinal cord neuropeptides .....	136
2.2.4.3.2 Electrical QST sensitisation .....	137
2.2.4.4 Behavioural data outcomes (gait analysis, VAS, STAPS, SVAPS, and video analysis) .....	138

2.2.4.4.1 Gait analysis.....	138
2.2.4.5.2 Other behavioural data outcomes (VAS, STAPS, SVAPS, and video analysis) .....	139
2.2.4.5 Physiological data outcomes (EDA, motor activity) .....	139
2.2.4.5.1 EDA .....	139
2.2.4.5.2 Motor activity.....	140
2.2.4.6 Statistical analysis.....	140
2.2.4.6.1 Treatment effect in centralised pain (spinal pain neuropeptides and electrical QST sensitisation).....	140
2.2.4.6.1.1 Spinal cord neuropeptides.....	140
2.2.4.6.1.2 Electrical QST sensitisation.....	140
2.2.4.6.2 Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes .....	141
2.2.4.6.2.1 Pain scales.....	141
2.2.4.6.2.2 Gait analysis, EDA, and motor activity .....	142
2.2.4.6.2.3 Video-automated behavioural analysis.....	142
2.2.4.6.3 Sensitivity of the behavioural and physiological outcomes to detect a treatment effect over time including, or not including, a centralised pain evaluation as factor .....	142
2.2.5 Results.....	143
2.2.5.1 Spinal cord neuropeptides.....	143
2.2.5.2 Electrical QST sensitisation.....	143
2.2.5.3 Relationship between factors and both the behavioural and physiological evaluations .....	144
2.2.5.3.1 Reliability of the pain scales .....	144
2.2.5.3.2 Relationship between the factor QST-stifle and both the behavioural and physiological evaluations.....	144
2.2.5.3.3 Relationship between the factor QST-tail and both the behavioural and physiological evaluations.....	145
2.2.5.3.4 Relationship between the spinal cord biomarkers and both the behavioural and physiological evaluations.....	145

2.2.5.4 Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect .....	145
2.2.6 Discussion .....	148
2.2.6.1 Sensitisation .....	149
2.2.6.2 Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes .....	150
2.2.6.3 Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect .....	152
2.2.7 Conflict of interest statement .....	152
2.2.8 Acknowledgements .....	153
2.2.9 References .....	153
2.3 Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model .....	159
2.3.1 Abstract .....	160
2.3.2 Keywords .....	161
2.3.3 Introduction .....	161
2.3.4 Materials and methods .....	164
2.3.4.1 Ethics statement .....	164
2.3.4.2 Animals .....	164
2.3.4.3 Phase 1: reliability of pain assessment methods in normal rats .....	165
2.3.4.3.1 Experimental design .....	165
2.3.4.3.2 Influence of environment .....	165
2.3.4.3.3 Influence of acclimatization protocols .....	166
2.3.4.3.4 Pain Assessment Methods .....	166
2.3.4.3.4.1 Mechanical sensitivity .....	166
2.3.4.3.4.2 Tactile sensitivity .....	167
2.3.4.3.4.3 Static weight bearing .....	167
2.3.4.3.4.4 Treadmill exercise .....	167
2.3.4.3.4.5 Operant testing .....	168
2.3.4.3.4.5.1 Operant testing without nociceptive stimulation .....	168
2.3.4.3.4.5.2 Operant testing with nociceptive stimulation .....	168



2.3.4.3.4.6 Rotarod.....	169
2.3.4.4 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model .....	169
2.3.4.4.1 Experimental design.....	169
2.3.4.4.2 Acclimatization period and baseline assessment .....	169
2.3.4.4.3 Intra-articular injection .....	169
2.3.4.4.4 Post-injection evaluation.....	170
2.3.4.4.5 Proteomic analysis .....	170
2.3.4.4.5.1 Reagents and solutions.....	170
2.3.4.4.5.2 Instrumentation .....	171
2.3.4.4.5.3 Bioanalytical methods.....	171
2.3.4.4.5.4 Spinal cord sample preparation.....	171
2.3.4.5 Statistical Analysis.....	172
2.3.4.5.1 Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats .....	172
2.3.4.5.2 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model .....	173
2.3.5 Results.....	174
2.3.5.1 Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats .....	174
2.3.5.1.1 Data variability and influence of environment .....	174
2.3.5.1.1.1 Mechanical sensitivity .....	174
2.3.5.1.1.2 Tactile sensitivity .....	174
2.3.5.1.1.4 Treadmill.....	175
2.3.5.1.1.5 Place escape/avoidance paradigm.....	176
2.3.5.1.1.6 Rotarod.....	177
2.3.5.1.2 Influence of acclimatization protocols and comparison of assessment method variability .....	177
2.3.5.2 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model .....	178
2.3.5.2.1 Static weight bearing.....	178
2.3.5.2.2 Punctate tactile allodynia evaluation .....	179
2.3.5.2.3 Place escape/avoidance paradigm.....	181
2.3.5.2.4 Treadmill.....	181
2.3.5.2.5 Neuropeptides .....	182
2.3.6 Discussion .....	183

2.3.7 Conclusion .....	189
2.3.8 Acknowledgements.....	190
2.3.9 Funding .....	190
2.3.10 Availability of data and supporting materials .....	190
2.3.11 Authors' contributions .....	190
2.3.12 Authors' information .....	191
2.3.13 Competing interests .....	191
2.3.14 Ethics approval and consent to participate.....	191
2.3.15 References.....	191
2.4 Spinal neuropeptide modulation, functional assessment and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis .....	199
2.4.1 Abstract .....	200
2.4.2 Keywords .....	201
2.4.3 Introduction.....	201
2.4.4 Materials and methods .....	203
2.4.4.1 Animals and induction of OA.....	203
2.4.4.2 Functional assessment of nociception.....	203
2.4.4.2.1 Sensory-reflexive evaluation .....	204
2.4.4.3 Proteomic analysis .....	204
2.4.4.3.1 Spinal cord sample preparation.....	204
2.4.4.3.2 Neuropeptidomic analysis.....	205
2.4.4.4 Assessment of cartilage lesions .....	205
2.4.4.5 Statistical analysis.....	205
2.4.5 Results.....	206
2.4.5.1 Functional assessment of nociception: sensory-reflexive evaluation .....	206
2.4.5.2 Temporal evolution of neuropeptides .....	207
2.4.5.3 Comparative regulations of spinal neuropeptides.....	209
2.4.5.4 Cartilage lesions.....	211
2.4.6 Discussion .....	213
2.4.7 Conclusion .....	215
2.4.8 Competing interests .....	215

2.4.9 Authors' contributions .....	216
2.4.10 Acknowledgements and funding.....	216
2.4.11 References.....	217
2.5 Testing pregabalin analgesic efficacy in a rat model of osteoarthritis pain: interest in functional neuropeptidomics.....	220
2.5.1 Abstract .....	221
2.5.2 Keywords .....	222
2.5.3 Introduction.....	222
2.5.4 Materials and methods .....	224
2.5.4.1 Animals.....	224
2.5.4.2 Experimental design.....	224
2.5.4.2.1 Pre-emptive treatment.....	225
2.5.4.2.2 Curative treatment.....	225
2.5.4.3 Functional assessment of nociception.....	226
2.5.4.3.1 Spontaneous evaluation .....	226
2.5.4.3.2 Sensory-reflexive evaluation .....	226
2.5.4.3.3 Operant evaluation.....	227
2.5.4.4 Proteomic analysis .....	227
2.5.4.4.1 Spinal cord sample preparation.....	227
2.5.4.4.2 Neuropeptidomic analysis.....	227
2.5.4.5 Statistical analysis.....	228
2.5.5 Results.....	229
2.5.5.1 Pre-emptive treatment.....	229
2.5.5.1.1 pPGB treatment temporarily inhibited the right hind limb alteration in weight bearing induced by MIA, which is not maintained within time. ....	229
2.5.5.1.2 pPGB treatment completely reversed tactile allodynia.....	230
2.5.5.1.3 PEAP failed to detect the effect of pPGB medication. ....	231
2.5.5.1.4 pPGB medication inhibited the increased expression of excitatory neurotransmitters.....	231
2.5.5.2 Curative medication.....	233

2.5.5.2.1 cPGB treatment failed to counteract the right hind limb alteration in weight bearing induced by MIA. ....	233
2.5.5.2.2 cPGB treatment partially reversed tactile allodynia. ....	234
2.5.5.2.3 cPGB treatment partially improved the operant test. ....	234
2.5.5.2.4 Spinal cord neuropeptides quantification was a sensitive method to detect changes occurred by a curative medication. ....	235
2.5.6 Discussion .....	236
2.5.7 Conclusions.....	243
2.5.8 Conflicts of interest.....	244
2.5.9 Acknowledgements.....	244
2.5.10 Funding .....	244
2.5.11 References.....	245
2.6 Osteoarthritic pain model influences pain spinal neuropeptidomics and functional phenotype: A pilot study in female rats .....	253
2.6.1 Abstract .....	254
2.6.2 Keywords .....	255
2.6.3 Introduction.....	255
2.6.4 Materials and methods .....	256
2.6.4.1 Animals.....	256
2.6.4.1.1 Group description.....	257
2.6.4.2 Induction of OA .....	257
2.6.4.2.1. Anesthesia and analgesia .....	257
2.6.4.2.2 Intra-articular MIA injection.....	257
2.6.4.2.3 Surgical procedures.....	257
2.6.4.3 Functional evaluations .....	258
2.6.4.4 Euthanasia and spinal cord collection.....	259
2.6.4.5 Neuropeptidomics.....	259
2.6.4.6 Statistical analysis.....	259
2.6.5 Results.....	260
2.6.5.1 Functional evaluations .....	261
2.6.5.2 Biomarkers.....	265

2.6.6 Discussion .....	266
2.6.6.1 Functional evaluations .....	266
2.6.6.2 Biomarkers .....	267
2.6.7 Conclusion .....	270
2.6.8 Acknowledgements .....	271
2.6.9 Declaration of conflicting interests .....	271
2.6.10 Funding .....	271
2.6.11 References .....	271
2.7 Compléments d'analyses de la quantification de la TTR spinale .....	276
2.7.1 Avant-propos .....	276
2.7.2 Matériels et méthodes .....	277
2.7.2.1 Collecte des moelles épinières .....	277
2.7.2.2 Protocole d'homogénéisation des moelles épinières .....	278
2.7.2.3 Quantification de la TTR par immunodosage .....	279
2.7.3 Résultats .....	279
2.7.4 Discussion .....	283
2.7.5 Références .....	284
3. Discussion .....	285
3.1 Phase de développement et d'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels de la douleur chronique par neuroprotéomique .....	285
3.1.1 Résumé des résultats de recherche .....	285
3.1.2 La neuroprotéomique est un outil de mesure fiable et valide de la douleur chronique : Identification de la TTR comme biomarqueur de la douleur .....	288
3.1.3 La TTR est modulée par un amalgame de plusieurs systèmes : nerveux, immunitaire et inflammatoire .....	290
3.1.4 Conclusion sur la TTR, limitations et perspectives .....	292
3.2 Phase de validation de l'utilisation de la neuroprotéomique afin d'évaluer l'impact de la douleur chronique dans le protéome spinal en partenariat avec le développement d'outils d'évaluation fonctionnelle de mesure de la douleur .....	293

3.2.1 Résumé des résultats de recherche utilisant le modèle chimique d'induction de la douleur chronique liée à l'arthrose .....	293
3.2.2 Justification du choix de l'espèce animale et du modèle expérimental de douleur animale.....	296
3.2.3 Justification de l'utilisation de la moelle épinière entière pour les dosages neuroprotéomiques.....	298
3.2.4 L'importance de la validation des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur chez des rats sains .....	300
3.2.5 L'utilisation du MIA IA est un modèle de douleur lié à l'arthrose permettant la validation des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur inflammatoire neurogène concomitante avec les méthodes neuroprotéomiques .....	302
3.2.5.1 Le MIA induit le développement de sensibilisation centrale.....	302
3.2.5.2 La neuroprotéomique est un outil de mesure fiable, valide et sensible de la douleur chronique liée à l'arthrose suite à une injection IA de MIA.....	304
3.2.5.3 L'injection de saline IA n'est pas neutre .....	305
3.2.5.4 Le MIA est un modèle expérimental de douleur permettant l'étude d'agents pharmacologiques analgésiques.....	306
3.2.5.5 La neuroprotéomique est la méthode la plus sensible, fiable et valide afin de détecter l'administration d'agents pharmacologiques analgésiques dans le modèle MIA de douleur chronique liée à l'arthrose.....	308
3.2.5.6 Conclusion sur le modèle MIA, limitations et perspectives .....	311
3.2.6 Résumé des résultats de recherche utilisant le modèle chirurgical d'induction de la douleur chronique arthrosique .....	312
3.2.6.1 Le modèle chirurgical d'induction de douleur arthrosique a induit des changements neurophysiologiques quantifiables associés à la sensibilisation centrale .....	314
3.2.6.2 Le modèle chirurgical de la combinaison CCLT-DMM est le modèle chirurgical le plus sévère et le plus fiable pour l'induction de douleur chronique liée à l'arthrose .....	315
3.2.6.3 Comparaison des modèles chirurgicaux avec le MIA .....	317

3.2.6.4 Raisonement et pertinence de la réalisation d'une étude pilote exploratoire et ses statistiques.....	318
3.2.6.5 Comparaison entre les modèles étudiés <i>versus</i> la maladie naturelle chez l'homme et les autres espèces .....	320
3.2.6.6 Conclusion sur les modèles chirurgicaux, limitations et perspectives.....	324
3.3 Les perspectives futures dans le domaine des biomarqueurs de la douleur.....	325
3.3.1 L'avenir de la recherche sur les biomarqueurs de la douleur .....	325
3.3.2 La considération d'un biomarqueur intégrant les systèmes immunitaires, inflammatoires et nerveux.....	332
3.3.3 Limitations de la quantification d'un biomarqueur .....	333
4. Conclusion générale.....	336
Bibliographie.....	337

## Liste des tableaux

Tableau I.	Caractéristiques des différents types de fibres nerveuses.....	8
Tableau II.	Ethogram of dairy behavioral observations (video analysis). ....	106
Tableau III.	Veterinarian Pain Scale <sup>1</sup> used in this cow study.....	107
Tableau IV.	Technician Pain Scale used in this cow study. ....	108
Tableau V.	Mixed linear regression models ( <i>P</i> -value) for each of the pain outcomes for 12 Holstein cows and results of the planned comparison at baseline. ....	113
Tableau VI.	Treatment effect without including the predictors. ....	146
Tableau VII.	Test-retest reliability of the tactile sensitivity evaluation.....	174
Tableau VIII.	Test-retest reliability of the static weight bearing. ....	175
Tableau IX.	Coefficient of variation (CV) for each outcome and variation in CV between four protocols of acclimatization. ....	178
Tableau X.	Mean and standard deviation of the punctate tactile allodynia evaluation by experimental group over time. ....	180
Tableau XI.	Neuropeptides inter-group comparisons in the monosodium iodoacetate osteoarthritis rat model. ....	183
Tableau XII.	Spinal temporal concentration of neuropeptides. ....	209
Tableau XIII.	Spinal concentration of neuropeptides. ....	211
Tableau XIV.	Cartilage lesion scores. ....	212
Tableau XV.	Mean and standard deviation (SD) of the punctate tactile allodynia evaluation by experimental group over days. ....	231
Tableau XVI.	Mean and standard deviation (SD) of the punctate tactile allodynia evaluation by experimental group over days. Descriptive statistics for curative medication of the paw withdrawal threshold of the right hind paw. ....	234
Tableau XVII.	Testing time effect and specific comparison <i>vs.</i> baseline of the static weight-bearing for the right hind limb. ....	261
Tableau XVIII.	Testing time effect and specific comparison <i>vs.</i> baseline of the paw withdrawal threshold for the right hind paw. ....	263
Tableau XIX.	Between-groups comparison of neuropeptide spinal concentrations in surgical and chemical models of osteoarthritis pain in rats. ....	265



Tableau XX.	Concentrations de la TTR spinale dans les modèles rongeurs. ....	280
Tableau XXI.	Sensibilité des différentes méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur suite à l'administration d'analgésiques dans un modèle MIA. ....	310
Tableau XXII.	Taux (%) de diminution de la régulation de la concentration des neuropeptides spinaux suite à l'administration d'analgésiques dans un modèle MIA.....	310

## Liste des figures

Figure 1.	Représentation schématique des nocicepteurs. ....	4
Figure 2.	Schéma général des voies de la douleur. ....	5
Figure 3.	Principaux sites de projection des fibres afférentes primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière. ....	10
Figure 4.	Activation d'un nocicepteur au niveau périphérique. ....	18
Figure 5.	Le phénomène de la sensibilisation centrale. ....	23
Figure 6.	Mécanismes des douleurs neuropathiques périphériques. ....	24
Figure 7.	Interactions entre un nocicepteur et les cellules non-neuronales. ....	29
Figure 8.	Interactions neurone-glie dans la moelle épinière lors d'une l'amplification de la douleur chronique. ....	31
Figure 9.	Synthèse d'un neuropeptide lors du transport axonal menant à la neurotransmission. ....	40
Figure 10.	Modèles animaux pour l'étude de la douleur. ....	66
Figure 11.	Changements structuraux et voies de signalisation d'une articulation normale (A) et arthrosique (B). ....	87
Figure 12.	Study design. ....	101
Figure 13.	Rescue analgesia. ....	110
Figure 14.	SDS-PAGE image. ....	111
Figure 15.	Cerebrospinal biomarkers. ....	112
Figure 16.	Spontaneous behavioral measurements. ....	115
Figure 17.	Visual analog scale (VAS) by group over time. ....	117
Figure 18.	Spinal cord concentrations of Substance P and transthyretin. ....	143
Figure 19.	Electrical quantitative sensory testing. ....	144
Figure 20.	Histogram of the least squares means (LSM) estimates $\pm$ SEM derived from generalized linear analyses. ....	147
Figure 21.	Treadmill exercise repeatability. ....	176
Figure 22.	Place escape/avoidance paradigm operant test repeatability (least squares mean $\pm$ standard error of the mean). ....	177

Figure 23.	Static weight-bearing (SWB) evolution after induction of osteoarthritis (least squares mean $\pm$ standard error of the mean).....	179
Figure 24.	Right hind paw (RHP) withdrawal threshold evolution after induction of osteoarthritis (least squares mean $\pm$ standard error of the mean).....	180
Figure 25.	Place escape/avoidance paradigm (PEAP) evolution after osteoarthritis induction (least squares mean $\pm$ standard error of the mean).....	181
Figure 26.	Spinal substance P (SP) and calcitonin gene related-peptide (CGRP) concentrations.....	182
Figure 27.	Right hind paw (RHP) withdrawal threshold (PWT) of the sensory-reflexive evaluation. ....	207
Figure 28.	Mean relative ratio (normalised with naïve group) of spinal temporal concentrations $\pm$ standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) at day (D) 3, D7, D14 and D21 post induction of osteoarthritis (OA) by 2 mg of monosodium iodoacetate (MIA). ....	208
Figure 29.	Neuropeptide spinal cord concentrations.....	210
Figure 30.	Masrocopic cartilage lesions of the right stifles. ....	212
Figure 31.	Ipsilateral (right) hind limb static weight-bearing evolution (least squares mean $\pm$ standard error of the mean) for pre-emptive pregabalin medication.....	230
Figure 32.	Mean relative ratio (normalized with naïve rats) of spinal concentrations $\pm$ standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 7 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection for inducing osteoarthritis pain.....	232
Figure 33.	Mean relative ratio (normalized with naïve rats) of spinal concentrations $\pm$ standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 21 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection for inducing osteoarthritis pain.....	233
Figure 34.	Number of times in the dark side. ....	235
Figure 35.	Mean relative ratio (normalized with naïve rats) of spinal concentrations $\pm$ standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide	

	(CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 21 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection for inducing osteoarthritis pain.....	236
Figure 36.	Percentage body weight (%BW) (mean $\pm$ standard deviation) of the right hind limb for the static weight-bearing by day (D). .....	262
Figure 37.	Paw withdrawal threshold (PWT) (mean $\pm$ standard deviation) of the right hind paw by day (D). .....	264
Figure 38.	Schématisation des étapes pour la collecte de la moelle épinière entière chez le rat de laboratoire.....	277
Figure 39.	Photo d'une moelle épinière de rat suite à sa collecte par la méthode de rinçage avec la saline dans le canal rachidien. ....	278
Figure 40.	Ratio relatif (moyenne $\pm$ SE) de l'évolution temporelle des concentrations de la TTR spinale pour les groupes MIA. ....	281
Figure 41.	Ratio relatif (moyenne $\pm$ SE) des concentrations de la TTR spinale à J+21 pour les groupes MIA 2 mg avec traitements pharmacologiques.....	282
Figure 42.	Ratio relatif (moyenne $\pm$ SE) des concentrations de la TTR spinale à J+56 pour les groupes chirurgicaux.....	283

## Liste des sigles et abréviations

$\alpha$ :	alpha – <i>alpha</i>
Å:	angström – <i>angstrom</i>
AA:	acide arachidonique – <i>arachidonic acid</i>
a.a.:	acide aminé – <i>amino acid</i>
ACE:	enzyme de conversion de l'angiotensine – <i>angiotensin-converting enzyme</i>
ACh:	acétylcholine – <i>acetylcholine</i>
ADAMTS:	une désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine – <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
Adj-P:	valeur de P ajustée – <i>adjusted P-value</i>
AINS:	anti-inflammatoire non-stéroïdien – <i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
AMPA:	acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate – <i>acide <math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionic acid</i>
AMPC:	adénosine monophosphate cyclique – <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
ARN:	acide ribonucléique – <i>ribonucleic acid</i>
ASIC:	canal ionique sensible à l'acide – <i>acid-sensitive ion channel</i>
ATF-3:	facteur de transcription activant 3 – <i>activating transcription factor-3</i>
ATP:	adénosine triphosphate – <i>adenosine triphosphate</i>
$\beta$ :	bêta – <i>beta</i>
BDNF:	facteur neurotrophique dérivé du cerveau – <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BK:	bradykinine – <i>bradykinin</i>
BW:	poids – <i>body weight</i>
°C:	degré celsius – <i>degrees celsius</i>
Ca <sup>2+</sup> :	calcium – <i>calcium</i>
CaMKII:	protéine kinase II Ca <sup>2+</sup> /calmoduline dépendante – <i>calmodulin-dependent protein kinase II</i>
Cav:	canal calcique voltage-dépendant de type L – <i>L-type voltage-dependant calcium channel</i>

CCK:	cholécystokinine – <i>cholecystokinin</i>
CCLT:	transsection du ligament croisé crânial – <i>cranial cruciate ligament transection</i>
CFA:	adjuvant complet de Freund – <i>complete Freund's adjuvant</i>
CGRP:	peptide relié au gène de la calcitonine – <i>calcitonin gene-related peptide</i>
CIDN:	contrôle inhibiteur diffus induit par des stimulations nociceptives – <i>diffuse noxious inhibitory control</i>
CI:	intervalle de confiance – <i>confidence interval</i>
Cl:	chlore – <i>chloride</i>
cm:	centimètre – <i>centimeter</i>
COMBO:	combinaison d'une transsection du ligament croisé crânial avec une déstabilisation du ménisque médial – <i>combination of cranial cruciate ligament transection with a destabilisation of medial meniscus</i>
COX-2:	cyclooxygénase de type 2 – <i>cyclooxygenase type 2</i>
CRLR:	récepteur de la calcitonine – <i>calcitonin receptor-like receptor</i>
CSF:	liquide céphalorachidien – <i>cerebrospinal fluid</i>
FSC:	facteur de stimulation des colonies – <i>colony-stimulating facteur</i>
Cv:	canal calcique – <i>calcium channel</i>
CV:	coefficient de variation – <i>coefficient of variation</i>
C-X-C:	chimiochine (motif C-X-C) ligand (CXCL) – <i>chemokine (type C-X-C) ligand (CXL)</i>
D:	jour – <i>day</i>
δ:	delta – <i>delta</i>
DA:	dopamine – <i>dopamine</i>
DAG:	diacylglycérol – <i>diacylglycerol</i>
DAMP:	motifs moléculaires associés à un danger – <i>damage-associated molecular patterns</i>
DLSM:	différences des estimés des moindres carrés – <i>differences of estimated least squares means</i>
DMM:	déstabilisation du ménisque médial – <i>destabilisation of medial meniscus</i>
DOR:	récepteur opioïde de type delta (δ) – <i>delta (δ) opioid receptor</i>

DYN:	dynorphine – <i>dynorphin</i>
ε:	epsilon – <i>epsilon</i>
EDA:	activité électrodermique – <i>electrodermal activity</i>
END:	endorphine – <i>endorphin</i>
ENK:	enképhaline – <i>enkephalin</i>
g:	force gravitationnelle – <i>gravitational force</i>
GABA:	acide gamma(γ)-aminobutyrique – <i>gamma(γ)-aminobutyric acid</i>
GAP:	jonctions <i>macula communicans</i> ou jonctions gap – <i>macula communicans junctions or gap junctions</i>
GDNF:	facteur neurotrophique dérivé de la glie – <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GEE:	équations d'estimation généralisées – <i>generalized estimating equations</i>
GLU:	glutamate – <i>glutamate</i>
GRD:	ganglion de la racine dorsale – <i>dorsal root ganglia</i>
GVCD:	grandes vésicule à coeur dense – <i>large dense-core vesicle</i>
H <sup>+</sup> :	hydrogène – <i>hydrogen</i>
H:	heure – <i>hour</i>
Hz:	fréquence Hertz – <i>Hertz frequency</i>
HPA:	hypothalamique-hypophysaire-surrénale – <i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
HPLC-MS/MS:	spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide à haute performance – <i>tandem mass spectrometry coupled to a high performance liquid chromatography</i>
5-HT:	sérotonine – <i>serotonin</i>
IA:	intra-articulaire – <i>intraarticular</i>
IB <sub>4</sub> :	isoelectine B <sub>4</sub> – <i>isoelectin B<sub>4</sub></i>
ICC:	coefficient de corrélation intra-classe – <i>intraclass correlation coefficient</i>
ICSN:	inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine – <i>serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor</i>
IGF-1:	facteur de croissance semblable à l'insuline 1 – <i>insulin-like growth factor 1</i>

iGLUr:	récepteur ionotropique du glutamate – <i>ionotropic glutamate receptor</i>
IL:	interleukine – <i>interleukin</i>
IM:	intramusculaire – <i>intramuscular</i>
iNOS:	oxyde nitrique synthase inductible – <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IP <sub>3</sub> :	inositol triphosphate – <i>inositol triphosphate</i>
ISCS:	inhibiteurs sélectifs du captage de la sérotonine – <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>
IT:	intrathécale – <i>intrathecal</i>
J:	jour – <i>day</i>
K <sup>+</sup> :	potassium – <i>potassium</i>
KDa:	kilodalton – <i>kilodalton</i>
Kg:	kilogramme – <i>kilogram</i>
KKC2:	cotransporteur de chlorure de potassium 2 – <i>potassium chloride cotransporter 2</i>
KOR:	récepteur opioïde de type kappa (κ) – <i>kappa (κ) opioid receptor</i>
Kv:	canal potassique – <i>potassium channel</i>
L:	lidocaïne – <i>lidocaine</i>
LC:	<i>locus caeruleus</i> – <i>locus caeruleus</i>
LCR:	liquide céphalorachidien – <i>cerebrospinal fluid</i>
LHP:	patte arrière gauche – <i>left hind paw</i>
LPS:	lipopolysaccharide – <i>lipopolysaccharide</i>
LSM:	moyenne des moindres carrés – <i>least-square means</i>
MA:	activité motrice télémétrée – <i>telemetered motor activity</i>
MCP-1:	protéine chimiotactique monocytaire de type 1 – <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDC:	modulation de la douleur conditionnée – <i>conditioned pain modulation</i>
mg:	milligramme – <i>milligram</i>
Mg <sup>2+</sup> :	magnésium – <i>magnesium</i>
mGLUr:	récepteur métabotrope du glutamate – <i>metabotropic glutamate receptor</i>
MIA:	monosodium iodoacétate – <i>monosodium iodoacetate</i>



min:	minute – <i>minute</i>
miR ou miARN:	micro acide ribonucléique – <i>micro ribonucleic acid</i>
ml:	millilitre – <i>milliliter</i>
MMP:	métalloprotéinase de matrice – <i>matrix metalloproteinase</i>
MPT:	seuil de douleur mécanique – <i>mechanical pain threshold</i>
MOR:	récepteur opioïde de type mu ( $\mu$ ) – <i>mu (<math>\mu</math>) opioid receptor</i>
ms:	milli seconde – <i>milli second</i>
MS:	sensibilité mécanique – <i>mechanical sensitivity</i>
MRM:	surveillance des réactions multiples – <i>multiple reactions monitoring</i>
m/z:	masse/charge – <i>mass/charge</i>
N:	newton – <i>newton</i>
NA:	noradrénaline – <i>noradrenalin</i>
Na <sup>+</sup> :	sodium – <i>sodium</i>
Nav:	canal sodique voltage dépendant – <i>voltage-gated sodium channel</i>
ncARN:	acide ribonucléique fonctionnel non codant – <i>non-coding functional ribonucleic acid</i>
NEP:	endopeptidase neutre – <i>neutral endopeptidase</i>
NGF:	facteur de croissance neuronal – <i>nerve growth factor</i>
NK:	neurokinine (A ou B) – <i>neurokinin (A or B)</i>
NF- $\kappa$ B:	facteur de transcription nucléaire kappa B – <i>nuclear factor kappa B</i>
NMDA:	N-méthyl-D-aspartate – <i>N-methyl-D-aspartate</i>
N:	nombre d'animaux – <i>number of animals</i>
nmol:	nanomolaire – <i>nanomolar</i>
NO:	oxyde nitrique – <i>nitric oxide</i>
NOS:	oxyde nitrique synthase – <i>nitric oxide synthase</i>
NP $\gamma$ :	neuropeptide $\gamma$ – <i>neuropeptide <math>\gamma</math></i>
NP $\kappa$ :	neuropeptide $\kappa$ – <i>neuropeptide <math>\kappa</math></i>
NPY:	neuropeptide Y – <i>neuropeptide Y</i>
NRM:	noyau du <i>raphé magnus</i> – <i>nucleus raphe magnus</i>
NSAID:	anti-inflammatoire non-stéroïdien – <i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>

OA:	arthrose – <i>osteoarthritis</i>
OR:	récepteurs opioïdes – <i>opioid receptor</i>
%:	pourcentage – <i>percentage</i>
P:	probabilité – <i>probability</i>
PAG:	substance grise périaqueducale – <i>gray periaqueducal substance</i>
PAMP:	motifs moléculaires activés par un pathogène – <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
P2X <sub>3</sub> :	récepteur purinergique de l'ATP – <i>ATP purinergic receptor</i>
PC:	protéine convertase (1 ou 2) – <i>protein convertase (1 or 2)</i>
PEAP:	paradigme du comportement d'échappement / évitement – <i>place escape / avoidance paradigm</i>
pG:	protéine G – <i>protein G</i>
PGB:	prégabaline – <i>pregabalin</i>
PGs:	prostaglandines – <i>prostaglandins</i>
PK:	protéine kinase (A ou C) – <i>protein kinase (A or C)</i>
PLA <sub>2</sub> :	phospholipase A <sub>2</sub> – <i>phospholipase A<sub>2</sub></i>
PLCβ:	phospholipase C bêta – <i>phospholipase C bêta</i>
PPT:	préprotachykinine – <i>preprotachykinin</i>
PTAE:	évaluation ponctuelle de l'allodynie tactile – <i>punctate tactile allodynia evaluation</i>
PVF:	force verticale maximale – <i>peak vertical force</i>
PWT:	seuil de retrait de la patte – <i>paw withdrawal threshold</i>
QST:	test sensoriel quantitatif – <i>quantitative sensory testing</i>
RA:	analgésie de secours – <i>rescue analgesia</i>
RAGE:	récepteur des produits fin de glycation des protéines – <i>receptor for advanced glycation end products</i>
RAMP:	protéine modifiant l'activité des récepteurs – <i>receptor activity-modifying protein</i>
RB:	récepteur bradykinine (1 ou 2) – <i>bradykinin receptor (1 or 2)</i>
RBRV:	région bulbaire rostroventrale – <i>rostral bulbous area</i>
RCPG:	récepteur couplé aux protéines G – <i>G protein-coupled receptor</i>

RER:	réticulum endoplasmique rugueux – <i>rough endoplasmic reticulum</i>
rCGRP:	récepteur du peptide relié au gène de la calcitonine – <i>calcitonin gene-related peptide receptor</i>
RHL:	membre postérieur droit – <i>right hind limb</i>
RHP:	patte arrière droite – <i>right hind paw</i>
rNK:	récepteur neurokinine (1, 2 ou 3) – <i>neurokinin receptor (1, 2 or 3)</i>
RPM:	révolution par minute – <i>revolution per minute</i>
RR:	ratio relatif – <i>relative ratio</i>
RVM:	moelle rostrale ventromédiale – <i>rostral ventromedial medulla</i>
SC:	sous-cutané – <i>subcutaneous</i>
SD:	écart-type – <i>standard deviation</i>
SDS-PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium – <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE:	erreur standard – <i>standard error</i>
SEM:	erreur type de la moyenne – <i>standard error of the mean</i>
SNA:	système nerveux autonome – <i>autonomic nervous system</i>
SNC:	système nerveux central – <i>central nervous system</i>
SN:	système nerveux – <i>nervous system</i>
SNP:	système nerveux périphérique – <i>peripheral nervous system</i>
SP:	substance P – <i>substance P</i>
SST:	somatostatine – <i>somatostatin</i>
SSTR:	récepteur de la somatostatine (1 à 5) – <i>somatostatin receptor (1 to 5)</i>
STAPS:	échelle de douleur arthritique standardisée du technicien – <i>standardized technician arthritis pain scale</i>
STT:	somatostatine – <i>somatostatin</i>
SVAPS:	échelle de douleur arthritique standardisée du vétérinaire – <i>standardized veterinarian arthritis pain scale</i>
SWB:	distribution pondérale statique – <i>static weight bearing</i>
TENS:	neurostimulation transcutanée – <i>transcutaneous neurostimulation</i>
TFA:	acide trifluoroacétique – <i>trifluoroacetic acid</i>

TGFβ:	facteur de croissance de transformation bêta – <i>transforming growth factor beta</i>
TLR:	récepteur de type Toll – <i>Toll-like receptor</i>
TNF-α:	facteur de nécrose tumoral-alpha – <i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TNTC:	nombre total de croisement sur le tapis roulant – <i>treadmill number of total crossings</i>
TPS:	échelle de douleur du technicien – <i>technician pain scale</i>
TRESK:	canal potassique à deux domaines de pore – <i>two-pore domain potassium channel</i>
Trk:	récepteur de la tyrosine kinase (A ou B) – <i>receptor tyrosin kinase (A or B)</i>
TRP:	réticulopéritonite traumatique – <i>traumatic reticuloperitonitis</i>
TRPV:	récepteur vanilloïde à potentiel de récepteur transitoire – <i>transient receptor potential vanilloid receptor</i>
TS:	sensibilité tactile – <i>tactile sensibility</i>
TTR:	transthyrétine – <i>transthyretin</i>
μ:	micro – <i>micro</i>
μg:	microgramme – <i>microgram</i>
μL:	microlitre – microliter
μmol:	micromolaire – <i>micromolar</i>
VAS:	échelle visuelle analogue – <i>visual analog scale</i>
VEGF:	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire – <i>vascular endothelial growth factor</i>
VIP:	peptide intestinal vasoactive – <i>vasoactive intestinal peptide</i>
VPS:	échelle de douleur vétérinaire – <i>veterinarian pain scale</i>
V/V:	volume/volume – <i>volume/volume</i>
W/V:	poids/volume – <i>weight/volume</i>
γ:	gamma – <i>gamma</i>

*À mes trois précieuses filles, Florence, Éloïdy et Kamille, pour le bonheur que vous me procurez au quotidien et votre amour inconditionnel, sachez que : « La persévérance utilise le passé, le présent et l'avenir pour arriver à ses fins », citation de Maria Edgeworth 1849.*

*À mon mari, pour son soutien ne pouvant être quantifiable et notre amour se modifiant et grandissant à travers le temps.*

## Remerciements

À mon directeur de recherche, Dr Éric Troncy, pour son encadrement académique hors pair et son appui indéfectible pour la réalisation de ces travaux de recherche et la production de cette thèse. Il a toujours continué de croire en moi contre vents et marées et je lui en suis très reconnaissante! Merci de m'avoir rendue aussi polyvalente dans ce domaine et de n'avoir jamais cessé de repousser mes limites afin de me surpasser. Il est un mentor exceptionnel et j'ai beaucoup appris avec sa présence. Merci aussi pour son soutien financier et mes présences à plusieurs congrès internationaux. Merci pour tout!

À mon co-directeur, Dr Francis Beaudry, pour toutes les discussions scientifiques, son encadrement et son appui afin que je termine mes études aux cycles supérieurs malgré les épreuves de la vie. Merci aussi de m'avoir guidé dans ton domaine d'expertise lorsqu'il le fallait! Ton calme et ta grandeur d'âme font de toi un scientifique accompli dans ton domaine.

Aux membres de mon comité d'examen général de synthèse et aux membres de mon jury de thèse. Merci à tous pour le temps consacré à l'évaluation de mes travaux et pour vos judicieux conseils.

Au Dr Maxim Moreau, pour ton écoute, ton encadrement pour les statistiques et ton énergie débordante et contagieuse, merci Max de m'avoir soutenue dans toutes les sphères de mon parcours. Tu as été un excellent exemple de courage et de persévérance pour moi!

Aux Dr Martin Guillot et Dre Pascale Rialland, grâce à vous j'ai pu prendre le relais du flambeau et poursuivre vos projets de recherche. Merci de m'avoir permis de vous suivre!

Aux nombreux autres membres du laboratoire et de ses collaborateurs que j'ai pu côtoyer au fil des années, merci pour votre aide technique et vos précieux conseils!

À ma famille, pour votre soutien incontestable et notre noyau tissé serré!

À Florence, pour son exemple de courage et de ténacité!

# Introduction

La douleur chronique est un problème mondial et on estime que 20 % des adultes en souffrent et que 10 % en sont diagnostiqués chaque année, avec une prévalence mondiale d'environ 1.5 milliard de personnes (Goldberg et al., 2011), d'où l'importance majeure d'étudier ce phénomène. La douleur est une composante intégrale de nombreuses maladies et il est important de pouvoir la mesurer afin de surveiller de près la progression de la maladie et/ou la réponse de l'individu suite à un traitement pharmacologique.

L'utilisation des modèles animaux en recherche biomédicale est très répandue et les études sur les phénomènes de la douleur n'en font pas exception. Ces recherches permettent d'élucider les mécanismes physiologiques et pathophysiologiques de la douleur, dont le but ultime est de mettre au point de nouvelles méthodes de quantification de la douleur tout en identifiant des cibles thérapeutiques potentielles afin de permettre une meilleure gestion de la douleur, autant chez l'animal que chez l'humain. Les études *in vitro* apportent des éléments précieux dans la définition de certains événements moléculaires, mais pour comprendre de façon optimale l'interrelation complexe entre les différents mécanismes, les tissus et tout l'organisme, les études *in vivo* sur des modèles animaux validés sont nécessaires.

Présentement, l'un des problèmes majeurs se situe au niveau de l'aspect translationnel des modèles expérimentaux de la douleur animale. En effet, de plus en plus de voix s'élèvent pour dénoncer l'incapacité de la recherche translationnelle classique à révéler des traitements efficaces à long terme pour la douleur chronique (Mao 2009; Mogil et al., 2004; Vierck et al., 2008), majoritairement attribuable à la piètre qualité et reproductibilité des méthodes de quantification de la douleur dans les modèles animaux entre les différents laboratoires de recherche (Mogil 2017). Outre la présence de failles dans les méthodologies, l'absence de validité des méthodes d'évaluation de la douleur chronique est la principale cause d'échec dans ce manque de translation lors d'études sur la découverte analgésique (Mogil 2009).

Étant donnée la grande complexité du phénomène douloureux, il est donc primordial d'élaborer des modèles expérimentaux et des méthodes d'évaluation subjectives et/ou objectives fiables, valides et reproductibles mimant la douleur afin d'augmenter la validité de construit du modèle expérimental de la douleur animale et conséquemment, améliorer le bien-être animal.

Afin de remédier à ces problématiques, ce travail présente donc le développement d'outils d'évaluation fonctionnelle et neuroprotéomique de quantification de la douleur afin de détecter et élucider le phénomène de la douleur et de répondre spécifiquement aux questions de recherche suivantes :

- (i) Est-il possible d'identifier de nouveaux marqueurs de la douleur à composante neuropathique ?
- (ii) Peut-on quantifier la sensibilisation centrale, source de douleur neuropathique, au niveau spinal ?
- (iii) Les modèles animaux miment-ils suffisamment bien la douleur pour en étudier les mécanismes sous-jacents ?
- (iv) La neuroprotéomique est-elle une méthode spécifique, sensible ainsi que reproductible permettant de caractériser et quantifier la douleur de concert avec les méthodes d'évaluations fonctionnelles de la douleur ?



# 1. Recension de la littérature

## 1.1 La douleur

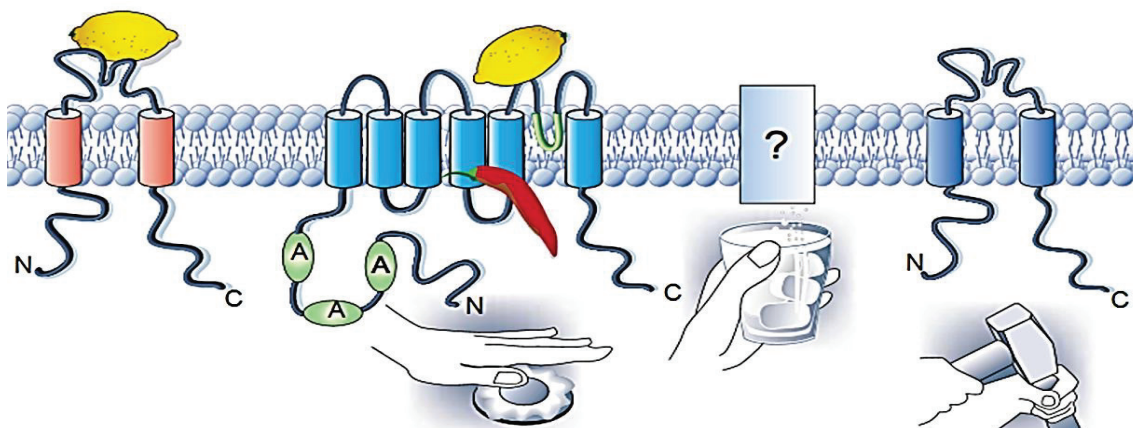
La douleur est un phénomène complexe. Selon l'Association Internationale pour l'Étude de la Douleur (*International Association for the Study of Pain*, IASP), la douleur se définit comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles, ou décrite en des termes évoquant de telles lésions ».

La douleur est une expérience multidimensionnelle s'articulant autour de quatre grandes composantes fondamentales : sensori-discriminative, motivo-affective, cognitive et comportementale (Apkarian et al., 2005). Sa fonction biologique primaire est de protéger l'organisme contre d'éventuelles atteintes en plus de favoriser la guérison en cas de blessure. En conditions normales, son rôle est donc bénéfique et souhaitable. La douleur est une expérience subjective et comportementale en réponse à un stimulus nociceptif physique, chimique ou psychologique.

- La composante sensori-discriminative est liée à la capacité d'analyser la nature, la localisation, la durée et l'intensité de la stimulation nociceptive. Cet aspect met en jeu des voies sensorielles relativement spécifiques.
- La composante motivo-affective confère à cette sensibilité son caractère désagréable. Toute douleur s'accompagne d'un retentissement touchant l'affectivité et l'émotion (angoisse, anxiété, dépression) et provoque des modifications comportementales (réactions d'attention, d'anticipation, de fuite). La diffusion de l'information douloureuse dans des régions corticales, notamment préfrontales et limbiques, en est responsable.
- La composante cognitive regroupe les processus mentaux participant au traitement des nombreuses informations de l'expérience douloureuse : signification de la douleur perçue, contexte situationnel, référence aux expériences douloureuses antérieures personnelles ou observées, décisions sur le comportement à adopter.
- La composante comportementale englobe l'ensemble des manifestations verbales et non verbales observables chez l'individu qui souffre. Elle est réglée par les apprentissages antérieurs, l'environnement familial et ethnoculturel, les standards sociaux (âge, sexe).

### 1.1.1 Les bases neurophysiologiques de la douleur

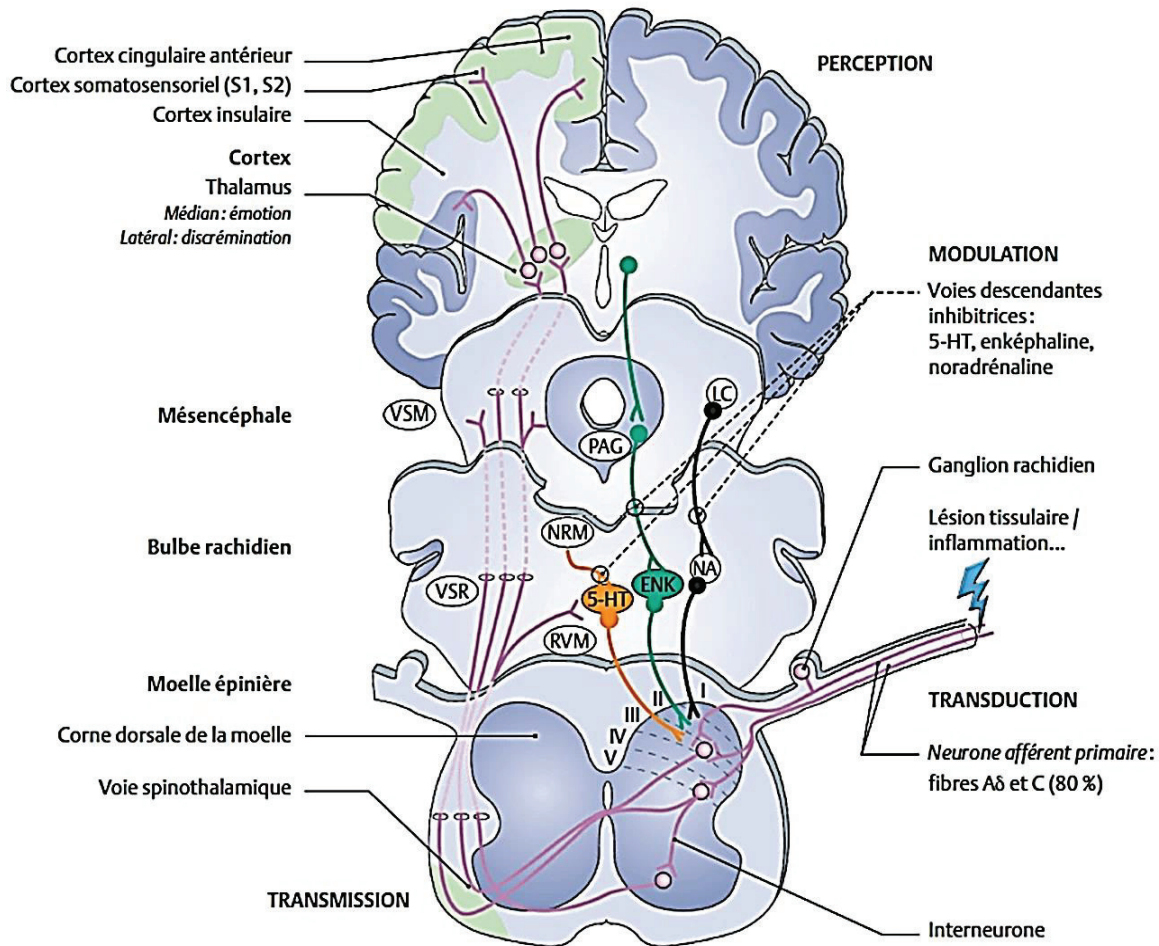
Le système nerveux central (SNC), composé du cerveau et de la moelle épinière, et le système nerveux périphérique (SNP), composé des nerfs et ganglions, sont les deux subdivisions majeures constituant le système nerveux (SN). Pour être perçue, la douleur doit d'abord être détectée par les terminaisons nerveuses présentes en périphérie. On retrouve au niveau afférent, 3 types de récepteurs sensoriels somatiques : les mécanorécepteurs (des récepteurs corpusculaires et des terminaisons nerveuses libres, sensibles à une pression cutanée), les thermorécepteurs (terminaisons nerveuses libres qui contrôlent la sensation de chaud et de froid) et les nocicepteurs (terminaisons nerveuses libres spécialisées dans la perception de stimuli douloureux) (Julius et al., 2001). La nociception se définit par l'activation de récepteurs en périphérie suite à des stimuli de nature thermique, chimique ou mécanique, et la transmission vers le cerveau des potentiels d'action associés qui seront propagés le long des neurones des fibres afférentes sous forme d'influx nerveux. C'est grâce à différents types de canaux ioniques situés à travers leur membrane cellulaire que les nocicepteurs sont sensibles à cette vaste gamme de stimulations douloureuses (**Figure 1**) (Julius et al., 2001).



**Figure 1. Représentation schématique des nocicepteurs.**

Les nocicepteurs sont des récepteurs spécialisés dans la perception des stimuli douloureux de nature chimique, thermique ou mécanique. Une fois activés, ces récepteurs vont entraîner la genèse d'un potentiel d'action par les neurones qui les expriment, ce qui se traduira en influx nerveux. Figure tirée de (Julius et al., 2001).

Il existe quatre étapes distinctes entre l'application d'un stimulus nociceptif initial et la sensation de douleur, la nociception correspondant à la transduction, la transmission et la modulation du signal nerveux en réponse à un stimulus nociceptif puis l'intégration du message nociceptif au cerveau, la perception (**Figure 2**) (Fields 2004).



**Figure 2. Schéma général des voies de la douleur.**

Les influx nerveux sont relayés à la corne dorsale de la moelle épinière par les fibres nerveuses Aδ et C suite à l'activation des nocicepteurs en périphérie. Les nocicepteurs sont associés majoritairement aux fibres Aδ et C. L'information nociceptive emprunte plusieurs voies entre la moelle épinière et le cerveau, où elle active de multiples régions. Des systèmes de modulation descendante de la douleur constitués par des projections descendantes du cerveau vers la corne dorsale peuvent moduler (inhiber ou faciliter) la transmission nociceptive spinale. Des connexions entre différentes structures cérébrales permettent l'intégration des diverses composantes de la douleur et sa modulation. Sérotonine (5-HT), enképhaline (ENK), *locus caeruleus* (LC), noradrénaline (NA), noyau du *raphé magnus* (NRM), substance grise périaqueducale (PAG), moelle rostrale ventromédiale (RVM), voie spino-mésencéphalique (VSM), voie spinoréticulée (VSR). Figure modifiée d'après (Fields 2004), tirée de (Beaulieu 2013).

La transduction correspond à la transformation d'un stimulus mécanique, thermique ou chimique en influx nerveux dans les terminaisons nerveuses sensibles spécialisées. Elle implique des canaux ioniques non-sélectifs qui dépolarisent les terminaisons libres des nocicepteurs par l'entrée des ions sodiques ( $\text{Na}^+$ ) et calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ), définies comme étant des neurones qui répondent de façon sélective aux stimuli engendrés par les lésions tissulaires (Sherrington 1906). Ceci active ainsi des canaux ioniques sodiques dépendants du voltage

(Nav1.6-1.9) (Waxman et al., 1999; Wood et al., 2002), qui permettent la génèse et la propagation des potentiels d'action. La transmission concerne le passage de l'influx nerveux de la périphérie à la moelle épinière et ensuite, vers les noyaux latéraux du thalamus par la voie spinothalamique ou vers différentes structures du tronc cérébral et les noyaux médians du thalamus par la voie spinoréticulée, puis finalement du thalamus au cortex (voie ascendante). La modulation correspond à l'ensemble des mécanismes par lesquels le message nerveux provenant des nocicepteurs peut être modulé au niveau spinal et/ou central au cours de la transmission de la périphérie au cortex. En plus des contrôles facilitateurs, il existe, en particulier, des contrôles inhibiteurs descendants issus du tronc cérébral qui s'exercent sur la transmission spinale des messages nociceptifs. Ces contrôles inhibiteurs impliquent les voies noradrénergiques, sérotoninergiques et enképhalinergiques (Le Bars et al., 1979b). La perception de la douleur, reliée à l'intégration au niveau du cerveau du message nociceptif en message conscient, est basée sur l'ensemble des expériences antérieures et des émotions d'un individu. Les centres supérieurs de la douleur permettent de réaliser la complexité de l'équilibre entre les composantes sensorielles / discriminatives (aires somesthésiques pariétales 1 et 2) et affectives / émotionnelles (cortex cingulaire antérieur, cortex insulaire ou *insula*) de la douleur. La nociception devient une douleur seulement lorsqu'il y a eu intégration corticale faisant intervenir la mémoire et l'émotion, ce qui peut expliquer la nature subjective de cette sensation. L'analgésie se définit comme un moyen de moduler, en réduisant partiellement ou en abolissant la perception du message douloureux (Beaulieu 2013).

#### **1.1.1.1 De la périphérie à la moelle épinière**

À la périphérie, les stimuli de nature mécanique, thermique ou chimique activent les nocicepteurs, entraînant la génèse d'un potentiel d'action qui est propagé le long des neurones des fibres afférentes primaires sous forme d'influx nerveux vers la corne postérieure de la moelle épinière (Julius et al., 2001). Les concentrations intracellulaires de potassium ( $K^+$ ) et d'anions, et extracellulaires de  $Na^+$  et chlore ( $Cl^-$ ) élevées sont à l'origine de ce potentiel membranaire au repos (-70 mV). L'action des substances pro-nociceptives sur les récepteurs excitateurs en périphérie modifie le potentiel membranaire du neurone, le rendant plus positif (+30 mV). La cellule se dépolarise si l'influx atteint le seuil de potentiel membranaire de -55 mV (Bullock 1951).

#### *1.1.1.1.1 Au niveau périphérique*

Les nocicepteurs sont formés par les terminaisons nerveuses libres des fibres sensorielles primaires répandues de façon ubiquitaire dans la peau, les muscles, les articulations ou les parois viscérales. Un récepteur doit posséder deux caractéristiques essentielles pour être qualifié de nocicepteur : (i) une capacité de réponse proportionnelle à l'intensité du stimulus (la fréquence de décharge augmente avec l'intensité de la stimulation), (ii) un seuil de réponse plus élevé (récepteurs dits de « haut seuil ») que les simples thermorécepteurs et mécanorécepteurs répondant à des stimuli légers (récepteurs dits de « bas seuil »). La réponse obtenue est dite sélective (Maixner et al., 1986). On distingue quatre types de nocicepteurs :

- Les nocicepteurs mécaniques répondent à la piqûre, au pincement ou à la torsion de la peau avec une décharge qui dure tout le temps de la stimulation, sans adaptation. Leurs champs récepteurs sont larges (1 à 8 cm<sup>2</sup>), composés de zones ponctuelles (1 mm<sup>2</sup>) séparées par des zones silencieuses. Leurs fibres afférentes sont essentiellement de type A $\delta$ .
- Les nocicepteurs thermiques répondent à des stimulus thermiques élevés (> 45 °C) ou bas (< 10 °C). Leurs champs récepteurs sont ponctuels (1 à 3 mm<sup>2</sup>) et ils sont liés essentiellement à des fibres amyéliniques (fibres C).
- Les nocicepteurs sensibles aux agents chimiques répondent aux agents toxiques externes comme aux substances produites par les tissus lésés.
- Les nocicepteurs polymodaux répondent à la fois à des stimuli nociceptifs mécaniques et thermiques. Ils sont liés à des fibres C amyéliniques. Ils constituent près de 90 % des fibres amyéliniques contenus dans un nerf cutané.

Les fibres sensorielles ne sont pas uniformes ; elles propagent le signal sensoriel à des vitesses de conduction différentes, proportionnelles à leur diamètre et à leur degré de myélinisation (**Tableau I**) (Beaulieu 2013). Il existe trois types de fibres ; alors que les fibres A $\alpha$ , A $\beta$  et A $\gamma$  sont impliquées dans la transmission motrice, du toucher léger et la proprioception, respectivement, les fibres A $\delta$  et C sont requises pour la perception de la douleur (Ma 2001). Les corps cellulaires des neurones des afférences primaires sont regroupés dans des structures appelées ganglions de la racine dorsale (GRD) et le diamètre de ces neurones dépend de leur degré de myélinisation (Beaulieu 2013).

**Tableau I. Caractéristiques des différents types de fibres nerveuses.**

Type de fibres	Myélinisation	Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	Vitesse de conduction (m/s)	Fonction
A $\alpha$	+++	10 – 25	60 – 100	Fibres motrices
A $\beta$	++	4 – 12	20 – 100	Fibres sensibles : toucher, pression
A $\gamma$	++	4 – 8	20 – 80	Fibres proprioceptives
A $\delta$	+	1 – 6	5 – 25	Douleur, température
B	+	< 3	3 – 15	SNA, fibres préganglionnaires
C	0	0,3 – 2	0,2 – 2,5	Douleur, température, SNA, fibres postganglionnaires

Système nerveux autonome (SNA). Tableau tiré et adapté de (Beaulieu 2013).

Les fibres A $\beta$  sont des fibres myélinisées de gros calibre à conduction rapide qui assurent la conduction des afférences non nociceptives puis elles sont majoritairement des mécanorécepteurs dont le seuil de réponse est très bas (Serge 2009). La stimulation de ces fibres ne produit pas de douleur dans les conditions normales de fonctionnement. Certains nocicepteurs A $\delta$  et C sont définis comme des récepteurs « silencieux », sur la base d'un seuil d'activation élevé, qui les rendent normalement peu sensibles aux stimuli douloureux simples. Ils ne seront recrutés qu'en cas de stimulation nociceptive prolongée ou particulièrement intense qui provoque la libération de facteurs tissulaires pro-inflammatoires, lesquels vont entraîner une réduction de ce seuil (Handwerker et al., 1991; Willis et al., 1997). Les fibres A $\delta$  sont des fibres myélinisées de plus petit calibre possédant des vitesses de conduction plus lentes que les fibres A $\beta$ . Elles ont un seuil de dépolarisation élevé et assurent la transmission rapide et précise de l'information nociceptive (douleurs aiguës bien localisées) et elles sont normalement responsables de la première douleur ressentie lors d'une stimulation nociceptive (Price et al., 1977). Il existe différents types de fibres A $\delta$  dont les mécano-nocicepteurs, qui ne répondent normalement qu'aux stimuli mécaniques susceptibles d'endommager les tissus cutanés (piqûres, pincements), ainsi que les récepteurs polymodaux, qui répondent à des stimulations mécaniques ou thermiques intenses, et parfois même chimiques (Treede et al., 1998). Les fibres C sont des fibres amyéliniques de faible calibre et conséquemment, ayant une vitesse de conduction plus lente. Ces fibres répondent préférentiellement à des stimulations nociceptives et conduisent



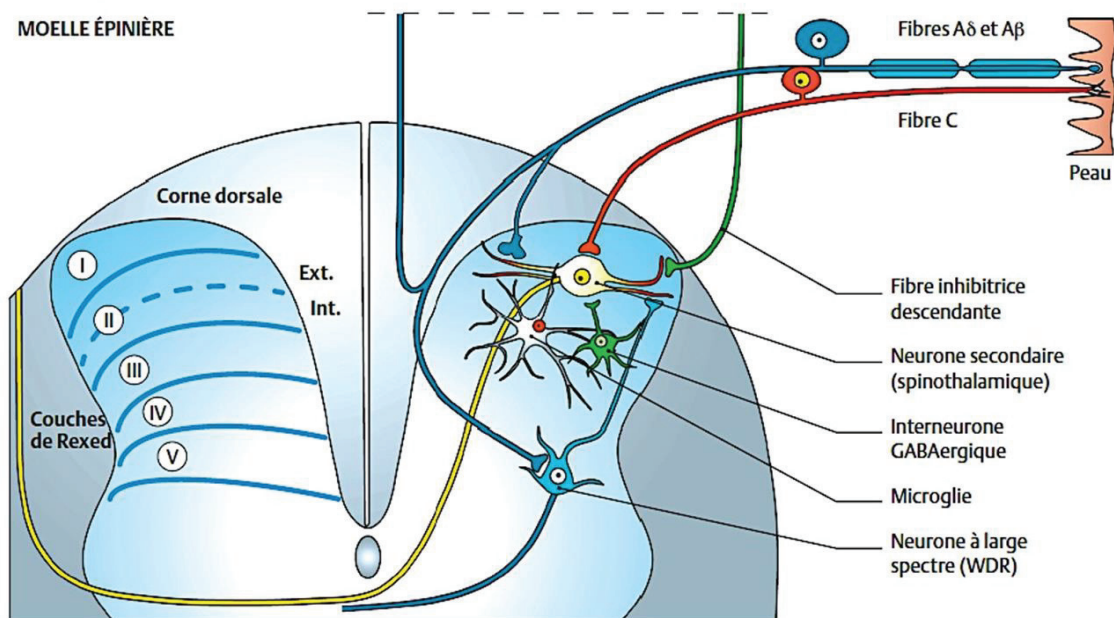
l'information de manière diffuse donc à l'origine de la douleur secondaire (Price et al., 1977). Elles représentent près de 80 % des fibres sensorielles au niveau des nerfs périphériques, et la très grande majorité d'entre elles sont des nocicepteurs. De par la complexité de leurs réponses aux stimulations thermiques, chimiques et mécaniques, ces fibres sont qualifiées de polymodales (Serge 2009; Gold et al., 2010). Les conditions pathologiques affectant les fibres C peuvent ainsi être associées à différentes conditions de douleur chronique (Baranauskas et al., 1998). Parmi les fibres C, on distingue les fibres peptidergiques, qui synthétisent des peptides tels que la substance P (SP), le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP), le Glutamate (GLU), et qui expriment le récepteur de la tyrosine kinase A (TrkA) du facteur de croissance neuronal (NGF). Les fibres non peptidergiques expriment une sous-classe de récepteurs purinergiques (P2X<sub>3</sub>) de l'adénosine triphosphate (ATP) ainsi que le récepteur du facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF) en plus d'avoir la capacité de lier l'isolectine B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>). Elles sont responsables de la seconde douleur, plus tardive et diffuse (sourde, mal localisée) qui s'apparente à une brûlure (Price et al., 1977; Serge 2009). Les deux types de fibres utilisent le GLU comme neurotransmetteur principal (Baranauskas et al., 1998; Julius et al., 2001; Schaible 2007).

#### 1.1.1.1.2 Au niveau spinal

Selon la classification de Rexed, la moelle épinière, composée de substance grise, est divisée en 10 couches (*laminae*) basée sur les différences de taille et de densité entre les différentes populations neuronales (Rexed 1952) (**Figure 3**). Le réseau de la corne dorsale s'étend de la couche I (fine et superficielle) à la couche VI (profonde). La couche II, aussi appelée substance gélatineuse, est habituellement subdivisée en couche II externe (IIo) et couche II interne (Ili). Les couches I-IIi et III-VI regroupent respectivement la corne dorsale superficielle et profonde. Les couches I, IIo, V et VI sont principalement impliquées dans le traitement de l'information nociceptive, alors que les couches III-IV concernent le traitement des informations somatosensorielles non-nociceptives (D'Mello et al., 2008; Todd 2002).

Les nocicepteurs et les fibres A $\beta$  (fibres du toucher et de la pression) font synapse principalement dans les couches superficielles (*laminae* I-II) dans la corne dorsale de la moelle épinière, au niveau des neurones secondaires (spinothalamiques ou neurones à large spectre) qui se projettent ensuite vers le cerveau. Une fois l'influx nerveux acheminé jusqu'à la terminaison

axonale des neurones afférents primaires, les potentiels d'action provoquent l'entrée massive intracellulaire de  $Ca^{2+}$  qui permet la libération de nombreux neuromodulateurs et molécules de signalisation dans la fente synaptique. Les médiateurs chimiques de cette synapse sont de deux types : acides aminés (a.a.) excitateurs et neuropeptides. Ces substances peuvent se lier à leurs récepteurs situés sur les neurones de deuxième ordre, notamment dans les couches I-II de la moelle épinière (Hunt et al., 2001; Todd 2002). L'activation des neurones permet la transmission de l'information douloureuse jusqu'au thalamus et l'aire parabrachiale (Hunt et al., 2001; Todd 2002). Une modulation du signal nerveux peut s'effectuer au niveau spinal par l'intermédiaire d'interneurones excitateurs ou inhibiteurs (glutamatergiques et gabaergiques, respectivement), de la microglie (cellules immunitaires du SNC qui incluent les astrocytes et les oligodendrocytes pour former les cellules gliales) ou des fibres inhibitrices descendantes provenant de diverses régions supraspinales (Vera-Portocarrero et al., 2006; von Hehn et al., 2012).



**Figure 3. Principaux sites de projection des fibres afférentes primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière.**

Les fibres nociceptives C (rouge) et A $\delta$  se projettent vers le neurone spinothalamique dans la couche supérieure (neurone jaune), tandis que les fibres non nociceptives myélinisées A $\beta$  se projettent vers les couches profondes. Le neurone de projection de second ordre est un neurone nociceptif non spécifique, appelé aussi neurone à convergence, qui peut répondre à la fois à des stimuli douloureux et non douloureux. Les neurones nociceptifs spécifiques sont localisés plus spécifiquement dans les couches superficielles (I et II) tandis que les neurones non spécifiques le sont majoritairement dans les couches profondes (IV-V). Figure modifiée d'après (Baron et al., 2010), tirée de (Beaulieu 2013).



### *1.1.1.1.3 De la moelle épinière au cerveau*

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, il existe trois grandes populations de neurones avec lesquelles les fibres afférentes primaires peuvent faire synapse dans la corne dorsale de la moelle épinière. On retrouve 3 principales catégories de cellules nerveuses : i) des interneurons inhibiteurs ou excitateurs qui servent de relais aux voies descendantes et ascendantes et qui participent au traitement local de l'information nociceptive ; ii) des neurones proprioceptifs spinaux intervenant dans les activités réflexes segmentaires ainsi que ; iii) des neurones de projection assurant le relais de la transmission de l'influx nociceptif vers les centres nerveux supérieurs (Tracey et al., 2007), où son analyse sera complétée (Hunt et al., 2001). Ces neurones de projection se classent en deux groupes : les neurones de projection nociceptifs spécifiques qui ne reçoivent leur information que des nocicepteurs afférents primaires (champ récepteur petit) et les neurones de projection nociceptifs non spécifiques, qui recueillent leur information autant des nocicepteurs afférents primaires que des mécanorécepteurs (Julius et al., 2001). Ils possèdent un champ récepteur très étendu qui couvre souvent l'ensemble d'un membre (Todd 2002). Les neurotransmetteurs interviennent dans la transmission de l'influx nerveux. Plusieurs peptides actuellement identifiés dans les cellules des GRD peuvent être considérés comme des transmetteurs. La SP, la somatostatine (SST) et le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) y figurent. D'autres transmetteurs, n'appartenant pas à la famille des peptides, interviennent aussi ; parmi eux, des a.a. tels le GLU, l'aspartate ou l'ATP (Fields et al., 1991; Le Bars et al., 2002).

Il existe plusieurs types de récepteurs excitateurs/inhibiteurs recevant les informations au niveau de la moelle épinière par les fibres C : les récepteurs ionotropiques (canaux ioniques) de l' $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) et du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ; les récepteurs métabotropiques (protéines transmembranaires) de la SP, du GLU, de la sérotonine (5-HT), de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) et de la NA. La SP et le GLU, en se liant à leurs récepteurs respectifs, neurokinine-1 (rNK-1) et AMPA ou NMDA exprimés par les neurones nociceptifs post-synaptiques, sont à l'origine de messagers chimiques responsables de la transmission de l'information nociceptive. Lors de situations physiologiques normales, les récepteurs NMDA (bloqués par l'ion magnésium ( $Mg^{2+}$ )), ne sont pas activés par le GLU, et

seuls les récepteurs AMPA jouent alors un rôle dans la transmission nociceptive. C'est le cas lors de la douleur de type aiguë (D'Mello et al., 2008; Le Bars et al., 2002; Neugebauer et al., 2009; Woolf et al., 1992).

La transmission de l'influx nerveux ne se résume pas exclusivement au passage de l'information nociceptive entre le neurone afférent primaire et le second neurone de projection dans la moelle épinière. Avant d'être acheminées vers les centres supérieurs, les voies de la nociception, comme toutes les afférences sensorielles, traversent le thalamus. En ce qui concerne plus spécifiquement les voies de la douleur, les chemins que peuvent prendre les informations nociceptives sont divisés en deux voies principales : la voie spinothalamique et la voie spinoréticulée (Fields et al., 1985). La voie spinothalamique (associée aux noyaux thalamiques latéraux) achemine l'information nociceptive des membres et du tronc, de la corne dorsale de la moelle épinière vers plusieurs noyaux thalamiques. La voie spinoréticulée (associée aux noyaux médians du thalamus) achemine quant à elle les afférences nociceptives de la moelle épinière vers des structures du tronc cérébral (région bulbaire rostroventrale (RBRV)), incluant la moelle rostrale ventromédiale (RVM), le noyau du *raphé magnus* (NRM), la substance grise périaqueducale (PAG) et le noyau réticulaire dorsal de la moelle épinière. (Willis 1985)

L'information nociceptive est ensuite globalement relayée des noyaux latéraux du thalamus au cortex somesthésique primaire et secondaire du système latéral, ainsi qu'au cortex cingulaire antérieur (système médian) et insulaire, alors que les noyaux médians du thalamus font relais vers le système limbique. Il y a plusieurs autres structures corticales qui sont indirectement activées par des projections corticocorticales mais elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (Neugebauer et al., 2009).

### **1.1.2 Les mécanismes de modulation de la douleur**

Tout au long de son trajet, le message nociceptif fait l'objet de modulations, facilitatrices ou inhibitrices. Le contrôle inhibiteur s'effectue plus spécifiquement sur les neurones à chacun des moments de la transmission de l'influx nerveux. Trois mécanismes regroupent ces systèmes inhibiteurs de modulation qui assurent le contrôle du message nociceptif : i) contrôle médullaire (théorie du portillon) ; ii) contrôle inhibiteur diffus induit par des stimulations nociceptives

(cellules « *OFF* ») ; iii) contrôle exercé par les centres supérieurs du SNC. Le contrôle facilitateur descendant (cellules « *ON* ») est issu du tronc cérébral et reconnue pour augmenter l'excitabilité d'une stimulation nociceptive au niveau spinal.

### **1.1.2.1 Modulations inhibitrices**

#### *1.1.2.1.1 Au niveau spinal (théorie du portillon)*

C'est au cours des années soixante que le Canadien Ronald Melzack et l'Anglais Patrick Wall proposent la théorie du portillon (« *gate control of pain* ») concernant les contrôles segmentaires exercés sur le message nociceptif en provenance de la périphérie (Melzack et al., 1965; Wall 1978). Cette théorie relate que la stimulation sélective des grosses fibres afférentes A $\alpha$  et A $\beta$  peuvent inhiber, *via* le recrutement d'interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse (couches I-II) des cornes postérieures de la moelle épinière, les petites fibres nociceptives A $\delta$  et C vers les neurones secondaires qui donnent naissance au système spinothalamique. Avec les années, des changements ont été apportés à cette théorie, mais de cette dernière, est née l'idée fondamentale de la modulation de la perception douloureuse à partir de son entrée dans la moelle épinière. Cette théorie est d'ailleurs à l'origine d'applications cliniques, dont la plus connue est la neurostimulation transcutanée (TENS conventionnel), basée sur la stimulation électrique des afférences non nociceptives A $\beta$  de la peau afin d'inhiber le message douloureux provenant des afférences nociceptives A $\delta$  et C (Garrison et al., 1994). À court terme, le TENS s'est avéré efficace pour soulager la douleur lombaire chronique (Brill et al., 1985) malgré la disparité de son utilisation (Deyo et al., 1990) due au blocage des effets analgésiques du TENS par la consommation de caféine (Marchand et al., 1995).

#### *1.1.2.1.2 Les contrôles inhibiteurs descendants*

Contrairement à la théorie du portillon, ce type d'inhibition provient des stimulations nociceptives qui activent un système descendant mettant en jeu diverses parties du SNC dont la PAG (opioïdes endogènes), le NRM (5-HT), le LC (NA) et les cornes postérieures de la moelle épinière (Basbaum et al., 1978; Fields et al., 1985). Une stimulation douloureuse, en plus de conduire l'information nociceptive vers les centres supérieurs par la voie spinothalamique, envoie des afférences vers différents centres du tronc cérébral, dont la PAG (Reynolds 1969) et le NRM (Basbaum et al., 1978). Selon ce modèle, une stimulation des fibres à petit diamètre

déclenche, vers les neurones nociceptifs des couches I et V des cornes postérieures de la moelle épinière, un système d'inhibition descendant. Cette activité analgésique est connue sous le nom de contrôles inhibiteurs diffus induits par des stimulations nociceptives (CIDNs) (Le Bars et al., 1979b, 1979c). La caractéristique essentielle des CIDNs réside dans le fait qu'ils peuvent être déclenchés depuis n'importe quel territoire corporel distinct du champ excitateur du neurone à la condition que le stimulus soit nociceptif. Ces structures envoient des efférences inhibitrices respectivement sérotoninergiques (cellules « *OFF* ») et noradrénergiques (proposant ici un modèle explicatif pour les propriétés analgésiques des agonistes  $\alpha_2$ -noradrénergiques (Di Cesare Mannelli et al., 2017)) vers les divers segments spinaux produisant ainsi une inhibition diffuse (Le Bars et al., 1979b). Ainsi, ces neurones sérotoninergiques ou noradrénergiques agissent directement et de façon post-synaptique sur les cellules de la corne dorsale. Ils recrutent aussi des interneurons enképhalinergiques et/ou gabaergiques qui, en retour, interviennent postsynaptiquement eux aussi sur les cellules de la corne dorsale. De plus, la terminaison centrale de plusieurs afférences primaires possède des récepteurs opiacés. Ainsi, l'interneurone contenant des enképhalines (ENK) agit sur les récepteurs opiacés, de façon présynaptique, sur l'afférence primaire en limitant la décharge transmise à la cellule de la corne dorsale. L'application de stimulations prolongées et intenses déclenche l'action analgésique des opiacés. Le CIDN produit donc une inhibition descendante qui ne se limite plus seulement à la région stimulée (Dickenson et al., 1981; Talbot et al., 1989) et pouvant donc produire une hypoalgésie globale. Par conséquent, les cellules du CIDN (cellules « *OFF* ») sont stimulées et inhibent la douleur suite à la micro-injection de morphine dans la RVM (Fields 2004).

#### *1.1.2.1.3 Au niveau des centres supérieurs du système nerveux central*

Les centres supérieurs du SNC jouent aussi un rôle prédominant dans la modulation de la douleur. Quatre centres cérébraux principaux du SN supérieur interviennent dans la perception de la douleur : l'aire somatosensorielle primaire (SI), l'aire somatosensorielle secondaire (SII) ainsi que le cortex cingulaire antérieur et insulaire (Calvino et al., 2006; Tracey et al., 2007). Ces régions sont importantes pour la modulation de la douleur. À partir du tronc cérébral et du thalamus, les afférences nociceptives établissent des liens, directs et indirects, vers des régions cérébrales comme le système limbique et le cortex frontal. Ces régions sont associées respectivement aux émotions et à la mémoire. Avec d'autres structures cérébrales,

elles affectent la perception de la douleur et modulent surtout l'aspect désagréable de la douleur (composante motivo-affective). L'effet placebo fait partie d'une modulation de la composante motivo-affective de la douleur par les centres supérieurs (Levine et al., 1978).

### **1.1.2.2 Les contrôles facilitateurs descendants**

Au niveau supraspinal, cette notion stipule que des stimulations de la RBRV à intensités élevées peuvent déclencher des effets analgésiques, mais des stimulations de la même région à des intensités 4 à 10 fois plus faibles ont au contraire des effets facilitateurs pro-nociceptifs (Zhuo et al., 1990, 1997).

La plus grande partie des informations décrites au niveau de la RBVR a été apportée par le travail de l'équipe de Fields réalisé chez le rat (Fields 1992; Fields et al., 1983). Trois familles de cellules qui se projettent vers la moelle épinière pour moduler la douleur (Fields et al., 1991) ont été caractérisées dans ce modèle en se basant sur leurs réponses à des stimulations thermiques nociceptives de la queue ; des cellules « *ON* », dont l'activité augmente juste avant que n'intervienne le réflexe nociceptif de retrait de la queue déclenché par la stimulation thermique nociceptive ; des cellules « *OFF* », dont l'activité tonique est interrompue juste avant que n'intervienne le réflexe nociceptif de retrait de la queue déclenché dans les mêmes conditions ; des cellules neutres caractérisées par leur absence de réponse aux stimulus nociceptifs. Dans ce contexte, l'activation des cellules « *OFF* » (CIDN) peut donc être corrélée avec le renforcement de l'inhibition descendante de la réponse nociceptive spinale, alors que celle des cellules « *ON* » peut l'être avec le renforcement de l'activation descendante de cette réponse : les cellules « *ON* » facilitent et les cellules « *OFF* » inhibent la transmission de l'information nociceptive au niveau spinal de la corne dorsale et des réponses qu'elles engendrent. L'administration de naloxone (antagoniste opioïde) ou un effet rebond d'un arrêt d'administration d'opioïdes peuvent stimuler les cellules « *ON* » et produire des effets hyperalgiques (Fields 2004).

En conclusion, c'est donc par la perception d'un contraste entre les activités de ces deux systèmes descendants concurrents (Besson et al., 1982) que le degré global d'excitabilité du réseau de neurones dans la corne dorsale de la moelle épinière est déterminé, un degré qui à son tour module la transmission de l'information douloureuse vers les structures nerveuses centrales supraspinales.

### **1.1.3 Les différents types de douleurs**

Il est possible d'identifier plusieurs sources de douleurs (aiguë, inflammatoire, neurogénique, musculo-squelettique, arthrosique, cancéreuse, etc.) que l'on peut classer en deux grandes catégories, soit la douleur de type nociceptive et la douleur de type neuropathique. La douleur nociceptive est causée par une lésion d'une partie du corps, tel qu'un muscle ou un os. Elle peut être d'origine somatique, viscérale ou inflammatoire. La douleur est ressentie comme constante, localisée et souvent comme persistante ou pulsatile. Une fois les lésions réparées, la douleur nociceptive disparaît généralement. La douleur neuropathique est provoquée par une lésion ou une atteinte des nerfs eux-mêmes (neurogénique ou fonctionnelle). Tout événement susceptible d'entraîner une blessure peut éventuellement léser des nerfs en même temps. La douleur neuropathique est souvent ressentie comme une sensation de brûlure, un coup de poignard ou une décharge électrique. Une douleur intense à l'effleurement est également courante. La douleur neuropathique peut persister plusieurs mois ou années (chronicisation), longtemps après la guérison de la cause apparente. Une telle douleur indique que le problème est lié au SN lui-même (Woolf et al., 2004).

#### **1.1.3.1 La douleur nociceptive**

La douleur nociceptive est généralement transitoire et fait suite à une stimulation nociceptive qui peut être de nature mécanique, thermique ou chimique. La réaction inflammatoire est la réponse à une exposition continue à une stimulation nociceptive de haute intensité. Ce phénomène produit donc une cascade d'évènements provoquant la libération de substances potentiellement nociceptives ainsi que la mise en jeu de nombreuses cellules immunitaires activées, telles que les macrophages et les cellules lymphocytaires. C'est un processus habituellement bénéfique dont le but est d'éliminer un agent pathogène et/ou de réparer les lésions tissulaires. Il arrive cependant que l'inflammation se maintienne et qu'elle se prolonge dans le temps, résultant en un phénomène d'inflammation chronique. De ce fait, ces mécanismes mènent à la sensation de douleur au-delà du retrait de la stimulation nociceptive.

##### *1.1.3.1.1 Activation et sensibilisation des nocicepteurs en contexte inflammatoire*

Un processus inflammatoire se développe suite à un traumatisme tissulaire, stimulant ou sensibilisant ainsi les nocicepteurs possédant un haut seuil d'activation (Gold et al., 2010). La

majorité des nocicepteurs se comporte comme des chémorécepteurs en dépit de leur capacité aussi de réagir à certaines stimulations mécaniques et thermiques (Le Bars et al., 2002; Wang and Woolf 2005). Cette fonction chémoréceptrice est essentielle pour engendrer les douleurs inflammatoires en convertissant les propriétés physico-chimiques des stimulations en activités électriques. La sensibilisation périphérique des fibres C et A $\delta$  se produit sur le site de l'inflammation (**Figure 4**) (Hedo et al., 1999). On distingue deux types d'activation des nocicepteurs : une action directe de la stimulation nociceptive sur le nocicepteur (lésion tissulaire cutanée, ostéoarticulaire, musculo-tendineuse, etc.) et, une action indirecte de la stimulation nociceptive par l'intermédiaire de substances algogènes endogènes libérées en cascade suite à la lésion tissulaire communément appelé la soupe inflammatoire. Les destructions tissulaires entraînent alors :

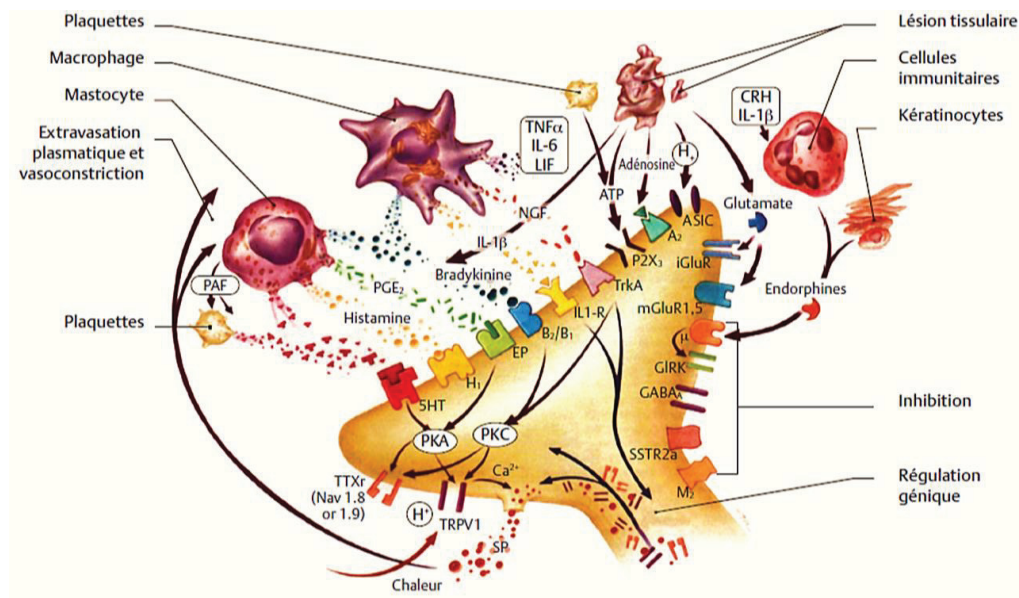
- Une libération de K<sup>+</sup> et d'ions H<sup>+</sup> (protons), de 5-HT agissant sur le récepteur inotrope 5-HT<sub>3</sub>, d'histamine, de bradykinine (BK), et de cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ ) et d'interleukines -1bêta (IL-1 $\beta$ ) et -6 (IL-6) libérés respectivement par les plaquettes, les mastocytes et les macrophages activés (von Hehn et al., 2012). Ces molécules agissent en synergie, provoquant un ensemble de réactions et la libération de nouveaux médiateurs (issus des tissus lésés, des plaquettes, des mastocytes, des fibres sympathiques et des terminaisons afférentes) dont les opioïdes endogènes (effet inhibiteur) et le NGF activant le récepteur TrkA (Donnerer et al., 1992), l'ATP et les protéases. Ces substances entraînent une hyperalgésie primaire : activation directe des nocicepteurs chemo-sensibles en modifiant la perméabilité aux ions des canaux membranaires, sensibilisation des nocicepteurs (abaissement des seuils d'activation) et modification des réponses (latence diminuée, réponse exagérée aux stimuli non nociceptifs mécaniques et thermiques). Le K<sup>+</sup> extracellulaire dépolarise directement les membranes cellulaires. L'ATP dépolarise directement certains nocicepteurs en activant les canaux ioniques ATP-dépendants. Les protéases interviennent notamment pour dégrader le kininogène, peptide très abondant au site de la lésion, en BK.

- Les lésions tissulaires conduisent également à la libération d'acide arachidonique (AA) (*via* l'activité enzymatique de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)) issu des phospholipides transmembranaires et secondairement transformé en puissants médiateurs de l'inflammation : les prostanoides, en particulier les prostaglandines (PGs) E<sub>2</sub>, et les leucotriènes. Ces substances



induisent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire (extravasation) ainsi qu'une augmentation de la sensibilité des nocicepteurs aux substances algogènes qui agissent *via* des récepteurs inotropes (canaux) ou métabotropes (couplés aux protéines G) ou récepteur à la neutrophine. Les prostaglandines ne sont pas à l'origine de la sensation douloureuse, mais elle peuvent accroître la sensibilité des nocicepteurs aux autres stimuli (von Hehn et al., 2012).

- L'activation des fibres amyéliniques entraîne également la conduction de potentiels d'action dans le sens antidromique vers les tissus sains adjacents à la lésion (réflexe d'axone de Lewis) (Harmon et al., 1968). Cette activation entraîne la libération de neuropeptides algogènes en périphérie, comme la SP, la neurokinine A (NKA) et le CGRP responsables de l'inflammation neurogène. La SP contribue à la vasodilatation locale et à la libération d'histamine et sensibilise d'autres nocicepteurs autour de la lésion initiale (Petho et al., 2012).



**Figure 4. Activation d'un nocicepteur au niveau périphérique.**

5-hydroxytryptamine (5-HT), adénosine 2 (A<sub>2</sub>), canal ionique sensible à l'acide (ASIC), adénosine triphosphate (ATP), bradykinine 2/1 (B<sub>2</sub>/B<sub>1</sub>), hormone de libération de la (CRH), récepteur de la prostaglandine E (EP), récepteur de l'acide γ-aminobutyrique A (GABA<sub>A</sub>), canal potassique à rectification entrante (GIRK), récepteur histaminique 1 (H<sub>1</sub>), récepteur glutamate ionotropique (iGluR), interleukine (IL), facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), récepteur muscarinique 2 (M<sub>2</sub>), récepteur au glutamate métabotropique (mGluR), facteur de croissance neuronale (NGF), récepteur purinergique 2X<sub>3</sub> (P2X<sub>3</sub>), facteur d'activation des plaquettes (PAF), prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), protéine kinase A (PKA), protéine kinase C (PKC), substance P (SP), récepteur 2a de la somatostatine (SSTR2a), facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), tyrosine kinase A (trkA), récepteur vanilloïde à potentiel de récepteur transitoire 1 (TRPV1), tétrotoxine résistante (TTXr). Figure d'après (Meyer RA 1994) tirée de (Beaulieu 2013).



Le canal ionique transducteur le mieux caractérisé est le canal cationique non sélectif du récepteur vanilloïde à potentiel de récepteur transitoire 1 (TRPV1), qui a un rôle bien établi dans la douleur inflammatoire périphérique (Huang et al., 2006) de même que les canaux purinergiques P2X<sub>3</sub> et sensibles aux protons (ASIC1-4) (Gold et al., 2010) permettant tous de convertir les stimulations en activités électriques par l'entrée de Na<sup>+</sup> et de Ca<sup>2+</sup>, et la sortie de K<sup>+</sup> de la cellule.

En conséquence, la synthèse de nouveaux canaux et récepteurs est induite suite à une sensibilisation post-transcriptionnelle. La surexpression des canaux sodiques voltage-dépendants (Nav1.6-9) est omniprésente en cas de processus inflammatoire. Des stimuli forts et persistants peuvent déclencher des changements dans l'expression des gènes dans les neurones afférents primaires grâce à l'activation de facteurs de transcription (Woolf et al., 2000). La plus importante est celle du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-κB) (Niederberger et al., 2008). Le NF-κB génère l'expression de plusieurs gènes codant pour l'inflammation dont des chimiokines (IL-1β et le TNF-α). Suite à cette activation génique, la libération d'une multitude de protéines est augmentée dans les neurones afférents primaires en réponse à l'inflammation : le CGRP, l'enzyme cyclooxygénase de type 2 (COX-2) qui génère des PGs, la dynorphine (DYN), l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique de type inductible (iNOS), qui génère le gaz d'oxyde nitrique (NO) ainsi que des facteurs de croissance tels que le NGF et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Des thérapies utilisant des anticorps contre le NGF se sont avérées efficaces dans le traitement des douleurs inflammatoires (Lane et al., 2010). Ces facteurs pro-inflammatoires mènent au recrutement des nocicepteurs avoisinant le site de blessure et produisent une sensibilisation (Kuner 2010; Latremoliere et al., 2009) et participant donc à cette amplification de la réactivité du nocicepteur. La diminution du seuil d'activation des nocicepteurs fait en sorte qu'ils deviennent activés par des stimuli non douloureux (activation par des fibres à bas seuils), phénomène appelé l'allodynie. Ce phénomène fait référence à l'apparition de douleur suite à un stimulus, qui normalement se trouve sous le seuil douloureux. Cette augmentation de stimulation des neurones innervant la lésion a pour conséquence d'élargir le champ récepteur qui répond de façon spécifique aux stimulations nociceptives. Il peut ainsi apparaître une perception de douleur ailleurs et ce phénomène se nomme l'allodynie secondaire. Une amplification de la douleur après stimulation au-dessus du

seuil nociceptif définie au départ fait référence à de l'hyperalgésie. Le phénomène inflammatoire peut produire une hyperalgésie primaire (sensibilisation périphérique au niveau de la lésion) et secondaire (reflétant une hyperexcitabilité centrale) (Kuner 2010; Latremoliere et al., 2009; Price et al., 1977).

#### *1.1.3.1.2 Sensibilisation centrale et inflammation*

L'hyperalgésie secondaire est présente lorsque l'origine de la douleur provient des mécanismes centraux. Elle est davantage connue sous le terme de sensibilisation centrale, une forme de plasticité synaptique de longue durée dans la corne dorsale (Woolf 1983). C'est une réponse accrue des nocicepteurs du SNC à une stimulation afférente normale ou inférieure au seuil d'activation, facilitant le traitement nociceptif. La sensibilisation centrale (**Figure 5**) est due à plusieurs processus cellulaires : l'augmentation de l'excitabilité membranaire ; la facilitation de la conduction synaptique ; la diminution des voies inhibitrices.

Une stimulation nociceptive qui est répétée à hautes fréquences produit une sommation temporelle des afférences nociceptives en provenance des fibres C à conduction lente. La sommation temporelle a pour effet d'augmenter la perception de l'intensité de la seconde douleur sans affecter la sensation de la première douleur par les fibres rapides A $\delta$  (Vierck et al., 1997). Le recrutement à haute fréquence des fibres C produit une augmentation du nombre de potentiels d'action des fibres de la moelle. Ce phénomène, communément appelé en anglais « *wind-up* » est passager, de courte durée et contribue à une augmentation de l'excitabilité des neurones nociceptifs secondaires (Li et al., 1999). Cependant, si la sensibilisation persiste, un autre mécanisme nociceptif est mis en place, soit la sensibilisation centrale. Ce phénomène implique trois grandes composantes : i) une sensibilisation en lien avec le GLU (activation du récepteur NMDA par délogement de Mg<sup>2+</sup>); ii) une désinhibition (diminution des voies inhibitrices); iii) une activation de la microglie (interaction entre le SNC et immunitaire) (Latremoliere et al., 2009).

Suite à l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison présynaptique du neurone venant de la périphérie, l'augmentation intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> qui en résulte permet aux vésicules d'emmagasiner remplies de neuromédiateurs tels que la SP, le CGRP, le GLU et le BDNF de fusionner avec la membrane cellulaire et de libérer leur contenu. Ces peptides sont libérés par les terminaisons centrales des fibres C et ont un effet excitateur sur les neurones de

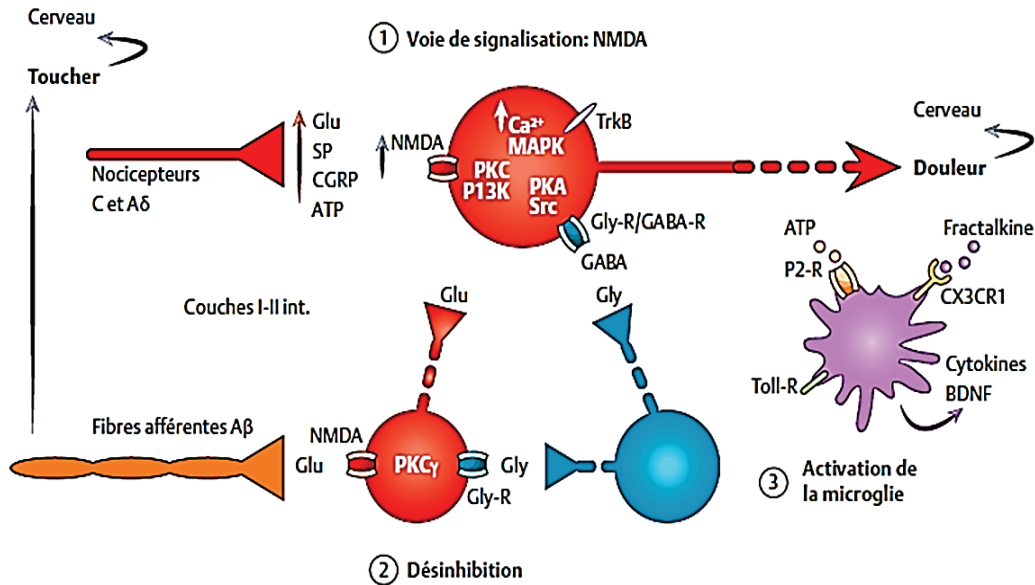
la moelle épinière en agissant sur des récepteurs spécifiques. Les principaux acteurs impliqués dans les changements synaptiques sont le rNK-1 pour la SP, le récepteur spécifique au CGRP (CGRP<sub>r</sub>) pour le CGRP, les récepteurs NMDA-AMPA (diminution du seuil d'activation), le récepteur métabotrope du GLU (mGLU<sub>r</sub>), le récepteur TrkB pour le BDNF et des récepteurs kinases comme EphrenB et EphBR, CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante), PKA, PKC, src, ERK, le facteur (CREB) de transcription liant l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), et le canal potassique Kv4.2 (D'Mello et al., 2011; Hu et al., 2011; Latremoliere et al., 2009; Nozaki et al., 2011). Ces liaisons participent et amplifient à leur tour l'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> (augmentation du courant entrant) dans le neurone postsynaptique, activant des seconds messagers tels que les enzymes COX-2 et iNOS, responsables respectivement, de la synthèse de PGs et de NO. Le NO et les PGs peuvent alors diffuser dans les neurones présynaptiques ou dans les cellules gliales et par ce mécanisme, être à l'origine d'une augmentation de la libération présynaptique de GLU, contribuant à une boucle de rétrocontrôle positif qui participe au développement de l'hyperexcitabilité centrale. Au niveau de l'activation des cellules gliales, une production importante de BDNF et d'IL-1 $\beta$  en résulte et une activation du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B qui permet le maintien à long terme du processus inflammatoire (Kuner 2010; Ren et al., 2010) tout comme dans la sensibilisation périphérique. Par contre, outre leur faculté d'accroître la libération présynaptique de neuromédiateurs comme le GLU, les seconds messagers agissent également en postsynaptique sur les PKA et PKC (Kuner 2010; Latremoliere et al., 2009) en favorisant l'activation des récepteurs NMDA, mGLU<sub>r</sub> et canaux ioniques. Par ailleurs, les seconds messagers créent une dépolarisation des membranes cellulaires postsynaptiques, rendant ainsi ces neurones plus facilement excitable, en réduisant les influences inhibitrices sur ces neurones comme celles exercées par les interneurons inhibiteurs gabaergiques et glycinergiques en inhibant directement le GABA et la glycine (Latremoliere et al., 2009), supportant l'allodynie tactile (Sivilotti et al., 1994). Cette désinhibition dans la moelle épinière augmente la transmission par les fibres A dans la corne dorsale (Baba et al., 2003).

Une autre voie d'impliquée est celle de la présence de cytokines pro-inflammatoires dans l'espace synaptique pouvant activer la production de PGs *via* l'activation de la COX-2 par l'IL-1 $\beta$  (Samad et al., 2001). Ces médiateurs pro-inflammatoires jouent aussi un rôle dans

l'augmentation de la synthèse des TRPV, résultant en une augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  (Latreoliere et al., 2009; Schaible et al., 2009; Wang and Woolf 2005).

Le NO et le  $\text{Ca}^{2+}$  agissent aussi au niveau transcriptionnel en modifiant l'expression de certains gènes, dont les gènes dits à expression immédiate (c-FOS, c-JUN, COX-2) et à réponse tardive comme les gènes codant notamment pour le récepteur AMPA, le récepteur de la SP (rNK-1), des neurotrophines tel que le BDNF, ou des récepteurs tel que le TrkB sur lequel ce dernier agit. Il y a donc une augmentation accrue du nombre de récepteurs disponibles. C'est le cas plus particulièrement pour les canaux calciques voltages-dépendants de type L (Cav) qui jouent un rôle important, soit le Cav1.2, et peuvent avoir une régulation bidirectionnelle par un micro acide ribonucléique (miR)-103 pour initier la sensibilisation centrale (Fossat et al., 2010). Les voies de signalisation intracellulaire dépendantes du calcium produisent des changements post-traductionnels et transcriptionnels dans de nombreuses protéines effectrices, en altérant leurs niveaux, leur distribution et leur activité fonctionnelle (Katano et al., 2011). Ces changements protéiques sont responsables d'activations cellulaires à long terme à l'origine d'une neuroplasticité centrale qui pourrait expliquer entre autres, la chronicisation des douleurs et les phénomènes de mémorisation.

En résumé, la sensibilisation centrale est caractérisée par une diminution du seuil d'activation des nocicepteurs, une augmentation de leur fréquence de décharge ou activité spontanée, une augmentation de leurs réponses à un même stimulus et le recrutement de fibres  $\text{A}\beta$  à faible seuil d'activation (hyperalgésie secondaire). Globalement, l'inflammation crée une sensibilisation du SN et une amplification du message nociceptif par une association de facteurs périphériques, centraux et humoraux.



**Figure 5. Le phénomène de la sensibilisation centrale.**

Trois composantes sont impliquées dans ce phénomène : (1) une sensibilisation en lien avec la voie de signalisation du glutamate (récepteur NMDA) ; (2) une désinhibition ; (3) une activation de la microglie. Adénosine triphosphate (ATP), facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP), récepteur des chimiokines CX3CR1 ou de la fractalkine (CX3CR1), acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) et son récepteur (GABA-R), glutamate (Glu), glycine (Gly) et son récepteur (Gly-R), protéine kinase activée par un mitogène (MAPK), facteur de croissance neuronale (NGF), N-méthyl-D-aspartate (NMDA), récepteur purinergique 2 (P2-R), protéine kinase A (PKA), protéine kinase C (PKC), substance P (SP), facteur de nécrose tumorale alpha ( $TNF-\alpha$ ), Toll-R : récepteur toll (Toll-R), tyrosine kinase B (trkB), transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Figure modifiée d'après (Basbaum et al., 2009), tirée de (Beaulieu, 2013).

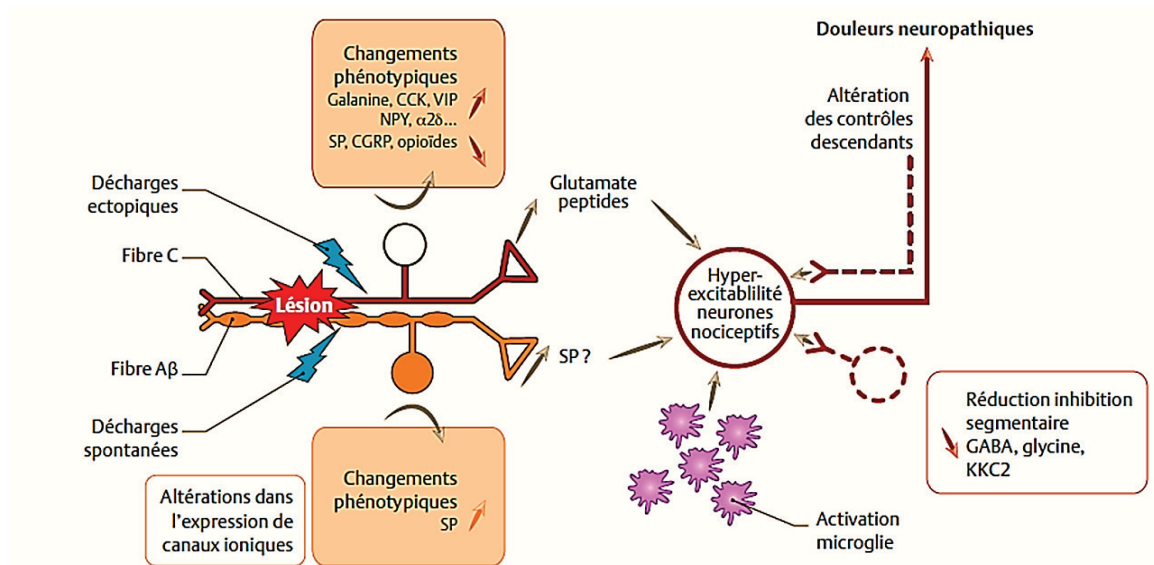
### 1.1.3.2 La douleur neuropathique

La douleur neuropathique entraîne des lésions du SN (Jensen et al., 2011). Les symptômes négatifs sont généralement la première indication de dommages au système somatosensoriel de diverses origines (métabolique, traumatique, toxique, idiopathique) et peuvent être détectés par des tests sensoriels quantitatifs ainsi que par un examen clinique, et dans des cas plus limités, par l'historique (anamnèse) et/ou un questionnaire. La cause des symptômes négatifs dans les neuropathies périphériques est directement liée aux neurones sensoriels primaires. Il peut en résulter une mort cellulaire, une transduction (due à une atrophie terminale) et/ou une conduction (due à la perte de l'axone périphérique) et/ou une transmission (due à la perte des terminaisons centrales) compromises (von Hehn et al., 2012). La perte de fonction peut se manifester sur tout le spectre sensoriel comme elle peut affecter des modalités spécifiques (Freeman 2009).

Lors d'une douleur d'origine neuropathique, le SNC est sensibilisé et on observe fréquemment de l'allodynie (douleur produite par un stimulus non douloureux) et de l'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux). On constate que la douleur peut être évoquée (par un stimulus) ou spontanée de manière continue ou paroxystique, démontrant le caractère pathologique de ce type de douleur. Elle se démarque de la douleur inflammatoire de par sa chronicité, la complexité de ses mécanismes et la résistance aux traitements conventionnels. Ceci résultera en une sensibilisation périphérique et/ou centrale, une neuroplasticité neuronale et une altération des systèmes de modulation.

### 1.1.3.2.1 Sensibilisation périphérique neuropathique

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'apparition de douleurs neuropathiques suite à des lésions nerveuses périphériques (**Figure 6**) dont l'apparition de décharges d'activités anormales au sein des nerfs lésés et des modifications métaboliques susceptibles de conduire à de véritables changements phénotypiques des fibres périphériques.



**Figure 6. Mécanismes des douleurs neuropathiques périphériques.**

Cholécystokinine (CCK), peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP), acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), cotransporteur de chlorure de potassium 2 (KCC2), neuropeptide Y (NPY), substance P (SP), peptide vasoactif intestinal (VIP). Figure modifiée d'après (Basbaum et al., 2009), tirée de (Beaulieu 2013).

Suite à une lésion nerveuse périphérique, une réaction inflammatoire est déclenchée tout comme lors d'une douleur nociceptive. Une libération de neuropeptides / neurotransmetteurs va s'en suivre, comme la SP, des PGs et des cytokines, ce qui provoque une diminution du seuil de

dépolarisation des nocicepteurs secondaire à la réaction inflammatoire (hyperexcitabilité) ainsi que par une distribution et une expression altérées des canaux sodiques dans les nerfs périphériques. Ces changements vont entraîner plusieurs modifications périphériques (Basbaum et al., 2009; Beaulieu 2013) :

- Des décharges spontanées et ectopiques des afférences au site de la lésion nerveuse. Une sensibilisation des nocicepteurs situés sur les fibres non nociceptives (fibres A $\beta$ ) (Wu et al., 2002) est suivi de transformations phénotypiques de ces fibres (synthèse de neuromédiateurs pronociceptifs tel que la SP et le BDNF) (Neumann et al., 1996). Ce phénomène implique des changements dans l'expression des canaux ioniques (sur ou sous régulation), plus précisément des canaux sodiques voltage dépendants (Nav1.3, Nav1.6-1.9) (Kim et al., 2002; von Hehn et al., 2012), des canaux potassiques comme, le canal potassique à deux domaines de pore (TRESK) K<sub>2p18.1</sub>, qui devient sous-régulé de 30-40 % (Tulleuda et al., 2011) donc un maintien d'un état de dépolarisation, des canaux calciques voltages dépendants (surexpression de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ ) (Luo et al., 2001) et des récepteurs de la famille des TRP (Julius et al., 2001; Woolf et al., 2000);
- Une conduction par l'intermédiaire de courts-circuits/communications croisées entre les fibres A $\beta$  (gros calibres) et A $\delta$  et C (petits calibres). Ce phénomène de couplage électrique entre les fibres nerveuses entraîne une activation des fibres contiguës se prolongeant au-delà de la décharge initiale et aboutissant à une sensibilisation du nocicepteur (Amir et al., 1992) pouvant mener à de l'allodynie;
- Des ramifications ou des bourgeonnements axonaux des neurones afférents primaires et des neurones sympathiques (Woolf et al., 1992);
- L'implication du système immunitaire par le recrutement de macrophages au site de l'atteinte tissulaire activant les cellules de Schwann *via* une libération de l'IL-1 $\beta$ . Ces cellules synthétisent alors de nombreuses molécules dont le NGF et le TNF- $\alpha$ , leur permettant d'activer directement les nocicepteurs ou de les sensibiliser indirectement *via* les PGs (von Hehn et al., 2012). Le TNF- $\alpha$  est aussi reconnu pour participer aux changements mécanistiques des canaux sodiques (He et al., 2010).



#### 1.1.3.2.2 Sensibilisation centrale et douleur neuropathique

Le phénomène de sensibilisation centrale est également observé suite à une douleur neuropathique. L'activation prolongée des fibres C due à leur sensibilisation génère une libération accrue par les nocicepteurs de neurotransmetteurs comme décrit précédemment tels que la SP, le BDNF et le GLU, ce qui dépolarise suffisamment les neurones pour déplacer les ions  $Mg^{2+}$ , débloquent ainsi les récepteurs NMDA et provoquant une entrée massive de  $Ca^{2+}$ . Cette dernière provoque des modifications à long terme de l'excitabilité des neurones, notamment *via* l'activation de protéines kinases calcium dépendantes qui vont modifier les propriétés des protéines membranaires ou de la NOS (synthèse du NO). L'ensemble de ces activités est modulé par les a.a. inhibiteurs (GABA et Glycine) et par les neuropeptides, qu'ils soient d'origine périphérique ou centrale. Le complexe YAP/TAZ/ $\beta$ -caténine semble aussi impliqué dans la douleur neuropathique. L'accumulation de ce complexe au niveau nucléaire dans les cellules de la moelle épinière est reliée à l'hypersensibilité mécanique et l'inhibition de la formation de ce complexe destructeur par une petite molécule, la dCTB, tout comme par des siRNA ciblant spécifiquement YAP ou TAZ, supprime la douleur neuropathique des rats dans un modèle de douleur par constriction chronique du nerf sciatique (Xu et al., 2016). Ce processus implique la signalisation de la voie Wnt, qui en condition physiologique normale, a montré une implication positive dans la régulation des processus cellulaires lors de la formation des synapses, dans la neuroplasticité et la guidance des axons durant le développement du système nerveux, mais non pas da devient une voie critique dans le développement de la douleur neuropathique (Zhang et al., 2013; Liu et al., 2015). En effet, une altération neuronale semble récapituler les événements qui se produisent durant le développement neurologique normal. Ce sont les régulateurs transcriptionnelles YAP et TAZ qui orchestrent l'absence de réponse de la voie Wnt dans cette pathogenèse *via* leur incorporation avec le complexe de destruction  $\beta$ -caténine, devenant une clé potentielle de la douleur neuropathique (Xu et al., 2016).

Tous ces changements entraînent une diminution du seuil d'activation des neurones de la corne postérieure ainsi qu'une augmentation de l'intensité et de la durée de la réponse au stimulus (Woolf et al., 1992). Cette stimulation accrue des nocicepteurs mène à la sensibilisation centrale et à l'activation de cascades enzymatiques. Des modifications métaboliques dans les corps cellulaires de neurones afférents primaires vont aussi être responsables des modifications



de la synthèse et de la libération des neuropeptides ainsi que de l'expression de plusieurs centaines de gènes (Costigan et al., 2002) comme une régulation à la hausse des récepteurs NMDA. L'activation des cellules gliales est également observée dans la sensibilisation centrale suite à une douleur neuropathique. Une modulation insuffisante des contrôles descendants inhibiteurs par les interneurons gabaergiques est présente aussi due à une réduction de la concentration de GABA dans la moelle ou une destruction / dysfonctionnement des interneurons inhibiteurs (Sivilotti et al., 1994). Une désinhibition a aussi été rapportée par une diminution de l'expression du canal transporteur de chlorure de potassium (KCC2), normalement reconnue pour maintenir la dépolarisation des interneurons inhibiteurs et également activé par la présence de GABA (Coull et al., 2003). Des mécanismes neuro-immunitaires faisant intervenir les cellules gliales sont aussi enclenchés. En effet, une lésion neuronale périphérique entraîne une activation importante de la microglie (les cellules microgliales expriment les mêmes marqueurs de surface que les macrophages en périphérie ; elles sont qualifiées de cellules immunitaires du SNC) (Calvo and Bennett 2012; Calvo et al., 2011; Calvo et al., 2010). Tous ces changements entraînent une diminution du seuil d'activation des neurones de la corne postérieure ainsi qu'une augmentation de l'intensité et de la durée de la réponse au stimulus. Le message douloureux est ensuite conduit vers le thalamus et le cerveau.

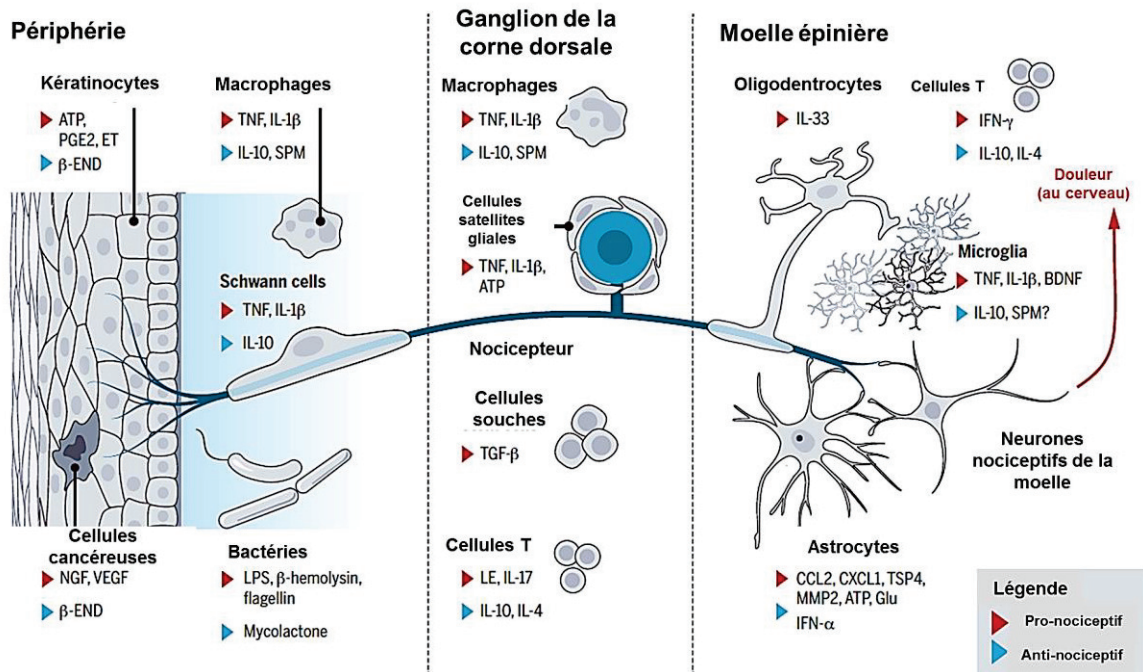
#### **1.1.4 Le phénomène de neuroplasticité**

La plasticité neuronale montre que le cerveau est un système dynamique, en perpétuelle reconfiguration (Ploner et al., 2011). Suite à des lésions périphériques, des modifications morphologiques complexes se développent dans toutes les composantes (sur ou sous expression des neuromédiateurs et de leurs récepteurs, des seconds messagers, etc.) du système nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière. Des ramifications des neurones de gros calibre des fibres non nociceptives A $\beta$  vers les couches superficielles de la moelle (*laminae* II) sont aussi une hypothèse supportant le développement de l'allodynie dans l'optique où les neurones de la *laminae* II activés normalement et exclusivement par des stimulations nociceptives sont aussi activés par des stimulations non nociceptives (Woolf et al., 1992). Ces changements anatomiques peuvent aussi être d'ordre phénotypique associé aux fibres C. La plasticité neuronale durant la douleur neuropathique n'est pas seulement limitée à la moelle épinière et une multitude de changements peuvent être observés en réponse à un stimulus lors d'une douleur

aiguë ou chronique (Apkarian et al., 2011; Tracey 2011). La neuroimagerie fonctionnelle a permis d'identifier un réseau de plusieurs régions du cerveau activé par un stimulus nociceptif, que l'on nomme la matrice de douleur, qui inclut le cortex médian préfrontal, le noyau accumbens, le cortex cingulaire antérieur, le cortex insulaire, l'amygdale, la PAG, le LC et la RVM (von Hehn et al., 2012), tout comme le cervelet (Moulton et al., 2011). Les régions activées pendant la douleur nociceptive aiguë diffèrent de celles activées lors d'une douleur chronique (Schweinhart et al., 2006), et ces mêmes zones de douleur sont activées différemment suite à des stimuli nociceptifs chez des patients sains en comparaison avec des patients souffrants de douleur chronique (Baliki et al., 2011). Il existe également des différences documentées entre une douleur de type spontanée et évoquée (Parks et al., 2011). Les signaux d'imagerie en réponse à une douleur individuelle pourraient devenir utiles afin de lier le phénotype de la douleur au génotype de cette dernière (Tracey 2011).

### **1.1.5 La régulation de la douleur par les cellules non-neuronales**

Plusieurs types de cellules non-neuronales peuvent influencer la sensation de douleur lors d'une pathologie ou d'une résolution de cette dernière, notamment les cellules immunitaires, gliales, épithéliales, mésenchymateuses, cancéreuses et bactériennes. Elles peuvent autant interagir au niveau du SNP ou que du SNC (cellules gliales). Malgré la diversité de ces cellules, la façon dont elles modulent la douleur est relativement similaire et conservée. Suite à une réponse à une lésion ou une stimulation nociceptive, les cellules non-neuronales libèrent des substances neuromodulatrices qui favorisent (pro-nociceptives) ou atténuent la douleur (anti-nociceptives) (**Figure 7**).



**Figure 7. Interactions entre un nocicepteur et les cellules non-neuronales.**

Ces cellules incluent les kératinocytes, les cellules de Schwann, les cellules satellites gliales, les oligodendrocytes, les astrocytes, ainsi que des cellules immunitaires (macrophage, cellules T), microglies, cancéreuses et des cellules-souches. Ces cellules non-neuronales produisent à la fois des médiateurs pro-nociceptifs (flèche rouge) et anti-nociceptifs (flèche bleue) qui peuvent lier leurs récepteurs respectifs sur le nocicepteur afin de moduler la douleur (sensibilité et excitabilité). La terminaison centrale du nocicepteur forme une synapse nociceptive avec un neurone postsynaptique dans la moelle afin de permettre la transmission du signal nociceptif vers le système nerveux central. Endorphine (END), endothéline (ET), Glutamate (Glu), interféron-alpha (INF-α), leucocyte (LE), lipopolysaccharide (LPS), facteur de croissance neuronale (NGF), Prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), adénosine triphosphate (ATP), interleukine (IL), facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), facteur de croissance transformant-béta (TGF-β), médiateurs spécialisés lipidiques dans la pro-résolution (SPM), interféron-gamma (INF-γ), thrombospondine-4 (TSP4), métalloprotéinase de matrice 2 (MMP2), chimiokine (motif C-X-C) ligand 1 (CXCL1), chimiokine ligand 2 (CCL2). Figure modifiée et tirée de (Ji et al., 2016).

### 1.1.5.1 Modulation de la douleur par les cellules non-neuronales : monocytes, macrophages, cellules T et kératinocytes

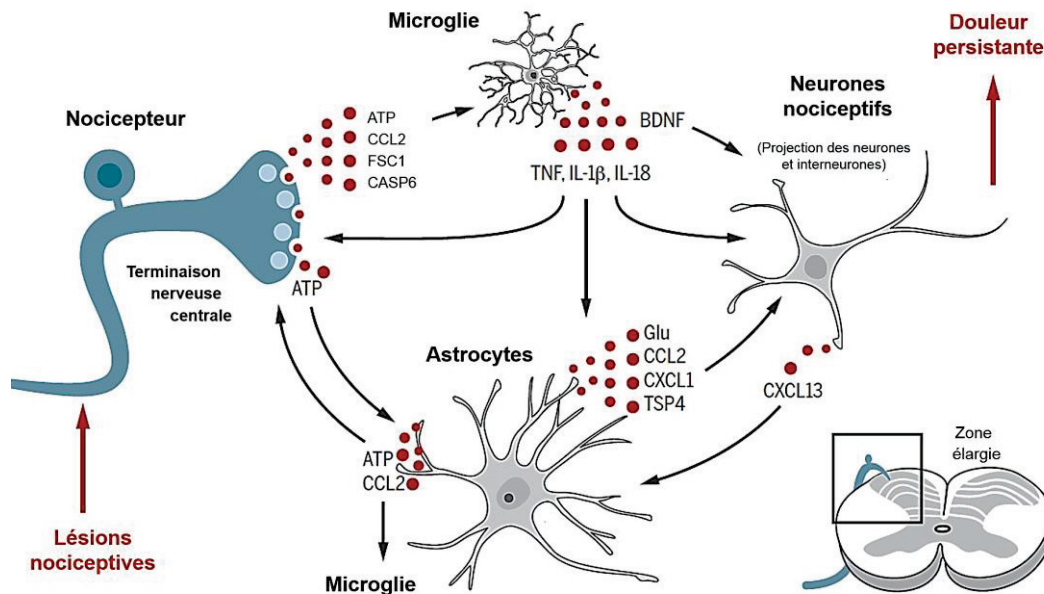
Les monocytes et les macrophages exercent trois fonctions principales dans le système immunitaire : phagocytose, présentation d'antigène et production de cytokines. Dans le SN, ils jouent un rôle actif en périphérie suite à un stimulus nociceptif en libérant des médiateurs pro-inflammatoires, le TNF et l'IL-1β (Zelenka et al., 2005). Ceci résulte en une augmentation de la transduction et de la conduction du message nociceptif suite à une modulation des canaux ioniques (le TRPV1, TRPA1 (ankyrine 1) et Nav1.7-1.9) (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2014).

Cependant, dans un modèle expérimental de lésion neuronale, la délétion périphérique des monocytes n'affecte pas le développement de la douleur neuropathique (Peng et al., 2016). Ces deux types cellulaires peuvent sécréter aussi des molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et des médiateurs lipidiques spécialisés dans la pro-résolution, comme des dérivés des acides gras omega-3 (résolvine, protectine, maresine) (Ji et al., 2014; Xu et al., 2010). Quant aux cellules T, outre leurs rôles au sein de l'immunité adaptative, elles sont impliquées aussi dans la douleur neuropathique. Suite à une lésion neuronale, les cellules T infiltrent le GRD et libèrent le médiateur pro-nociceptif de l'élastase leucocytaire, associé au développement de l'allodynie mécanique (Vicuna et al., 2015) et dans la moelle, les cellules T sont impliquées dans l'hypersensibilité mécanique (Costigan et al., 2009). Les kératinocytes sont les cellules primaires de l'épiderme. Elles résident près des terminaisons périphériques des nocicepteurs et produisent des médiateurs nociceptifs divers comme l'ATP, l'IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, l'endothéline, le NGF et des cytokines (Calvo, Dawes, et al., 2012). Ces cellules activent directement les nocicepteurs afin de démarrer le processus nociceptif. De plus, dans le SN, les cellules gliales (parfois nevroglie ou tout simplement glie, du grec γλοιός (gloios), « gluant ») sont les cellules qui forment l'environnement des neurones. Elles assurent le maintien de l'homéostasie, produisent la myéline et jouent un rôle de soutien et de protection du tissu nerveux en apportant les nutriments et l'oxygène, en éliminant les cellules mortes et en combattant les pathogènes. Pendant longtemps, l'implication des cellules gliales dans le traitement de l'information nerveuse a été ignorée par rapport au rôle prédominant des neurones, mais il est aujourd'hui reconnu qu'elles exercent une action modulatrice sur la neurotransmission bien que le détail de ces mécanismes reste mal compris. On distingue en général 4 principaux types de cellules gliales : la microglie ; les astrocytes ; les oligodendrocytes ; les cellules de Schwann (Ji et al., 2016).

#### **1.1.5.2 Les cellules gliales au niveau central : microglie, astrocytes, oligodendrocytes**

La microglie (ou microgliocytes) est une population de cellules gliales constituée de macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière formant ainsi la principale défense immunitaire active du SNC, supportant son rôle dans le phénomène douloureux (Ji et al., 2013). Après une lésion neuronale en périphérie, une prolifération et une activation rapide de la microglie sont observées et supportées par une régulation à la hausse des marqueurs de la

microglie, IBA1 et CD11b dans la moelle épinière. Les signaux qui activent spécifiquement la microglie sont l'ATP, les facteurs de stimulation des colonies (FSC) 1, les chimiokines (CCL2 et CX3CL1 (fractalkine)) et des protéases, provenant de la lésion ou de l'activation des neurones sensoriels (**Figure 8**).



**Figure 8. Interactions neurone-glie dans la moelle épinière lors d'une l'amplification de la douleur chronique.**

Une atteinte neuronale engendre une hyperactivité des nocicepteurs et la sécrétion de modulateurs de la glie au niveau des terminaisons centrales des fibres sensorielles nociceptives, causant l'activation de la microglie et des astrocytes dans la corne dorsale de la moelle épinière. Suite à son activation, la microglie et les astrocytes sécrètent à leur tour des neuromodulateurs afin de soutenir le processus de la douleur chronique, participant à une plasticité synaptique et neuronale. Glutamate (Glu), adénosine triphosphate (ATP), interleukine (IL), facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), facteur de nécrose tumorale (TNF), facteur de stimulation de la colonie 1 (FSC1), thrombospondine-4 (TSP4), métalloprotéinase de matrice 2 (MMP2), chimiokine (motif C-X-C) ligand (CXCL), chimiokine ligand 2 (CCL2). Figure modifiée et tirée de (Ji et al., 2016).

De plus, l'expression des récepteurs purinergiques de l'ATP et le récepteur CX3CR1 de la fractalkine est augmentée dans la microglie suite à une lésion nerveuse (Ji et al., 2013). L'activation de ces récepteurs résulte en une activation d'une cascade de signalisation intracellulaire *via* les protéines MAP kinases, produisant une libération de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, BDNF et de PGE<sub>2</sub> (Coull et al., 2005). Ces neuromodulateurs participent à une augmentation de l'excitabilité de la transmission synaptique (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et à la désinhibition des voies inhibitrices (BDNF). L'activation sélective de la microglie par la fractalkine est suffisante pour faciliter rapidement la force synaptique entre les fibres C afférentes et les neurones de projections dans la *laminae* I (Clark et al., 2015). La microglie est autant impliquée au niveau

du développement de la douleur chronique que dans le maintien et l'amplification de ce phénomène (**Figure 8**). Les astrocytes ont une forme étoilée, avec de nombreux prolongements radiaires. Ce sont les plus grosses cellules du tissu nerveux. On distingue les astrocytes de type I, qui sont en contact avec les capillaires sanguins, et les astrocytes de type II, entourant le neurone et la fente synaptique empêchant ainsi la dispersion des neurotransmetteurs. De plus, les astrocytes synthétisent des neurotransmetteurs. Ils maintiennent également les neurones en bon état de fonctionnement en leur apportant de l'énergie. Ils contribuent à maintenir l'équilibre de la composition du liquide extracellulaire. Grâce à leurs « pieds », les astrocytes assurent un lien fonctionnel entre les vaisseaux et les neurones : ils prélèvent les substrats énergétiques (glucose, oxygène) au niveau des vaisseaux sanguins et les amènent aux neurones, ils débarrassent également les neurones des substances de dégradation qui doivent être évacuées par les vaisseaux sanguins, aident au maintien de la barrière hématoencéphalique, la régulation de la concentration ionique interstitielle et la modulation de la transmission synaptique. Suite à une lésion neuronale, les astrocytes perdent leur capacité à maintenir des concentrations de  $K^+$  extracellulaire importante pour l'homéostasie, ce qui mène à une hyperexcitabilité neuronale (Ji et al., 2013). Une lésion neuronale induit une augmentation de l'expression des jonctions *macula communicans* (GAP) entre les astrocytes et les neurones, notamment la connexine-43. Normalement, ces jonctions sont importantes pour faciliter la transmission intercellulaire, mais une lésion neuronale change la fonction auparavant communication par une fonction de modulation paracrine de la connexine-43 (Chen et al., 2014). Cette régulation paracrine induit une augmentation de la libération de GLU, d'ATP et de chimiokines qui participe à potentialiser l'excitabilité de la transmission synaptique (Chen et al., 2014). Les chimiokines facilitent la douleur neuropathique *via* des interactions bidirectionnelles entre les neurones et les astrocytes. L'activation des astrocytes dans une douleur chronique est plus persistante que celle de la microglie, démontrant une contribution plus importante des astrocytes dans la chronicisation de la douleur. Les oligodendrocytes sont plus petits que les astrocytes et portent moins de prolongements qu'eux. Ils sont à l'origine des gaines de myéline entourant les axones des fibres nerveuses, participant de fait à la modulation de propagation de l'influx nerveux. Ce n'est que récemment que les oligodendrocytes ont été identifiés comme pouvant participer au phénomène de la douleur. Dans un modèle de douleur neuropathique, l'IL-33 libérée par les



oligodendrocytes contribue à l'hypersensibilité douloureuse *via* l'activation des MAP kinases et la voie NF- $\kappa$ B (Zarpon et al., 2016).

### **1.1.5.3 Glie périphérique : cellules de Schwann et cellules satellites gliales**

Les cellules de Schwann, comme les oligodendrocytes, assurent la myélinisation des axones, c'est-à-dire leur isolation électrique. Il existe néanmoins de petites différences entre ces deux types de cellules. Les cellules de Schwann n'existent qu'au niveau du SNP. Une cellule de Schwann forme la gaine de myéline autour d'un seul axone, alors que les oligodendrocytes peuvent myéliniser plusieurs axones (de différents neurones) au sein du SNC (en moyenne une dizaine). En réponse à une stimulation nociceptive, les cellules gliales du SNP, les cellules de Schwann et les cellules satellites gliales sont activées et relâchent une variété de médiateurs inflammatoires qui sensibilisent les nocicepteurs aux axones (cellules de Schwann) et aux corps cellulaires (cellules satellites gliales). Les cellules de Schwann sont activées suite à une lésion neuronale et impliquées dans la rupture de la barrière sang-neurone *via* la sécrétion de la métalloprotéinase de matrice 9 (MMP-9), promouvant le recrutement des cellules immunitaires du système vasculaire et conséquemment, relâchant davantage de médiateurs pro-nociceptifs (Calvo and Bennett 2012; Calvo, Dawes, et al., 2012). Les cellules satellites gliales entourent le corps cellulaire (soma) et elles sont directement couplées l'une à l'autre *via* les jonctions GAP. Ces cellules satellites gliales participent à la sensibilisation de la douleur chronique en sécrétant des cytokines et des MMPs qui régulent le clivage et l'activation de cytokines (Ji et al., 2013). Le soma libère aussi de l'ATP qui active le récepteur purinergique P2X<sub>7</sub> dans les cellules satellites, permettant la libération de TNF et subséquemment, augmentant l'excitabilité neuronale (Zhang et al., 2007). Par contre, l'activation des récepteurs P2X<sub>7</sub> peut aussi réduire la douleur par une diminution de la régulation des récepteurs P2X<sub>3</sub> dans les neurones nociceptifs (Chen et al., 2008).

### **1.1.5.4 L'implication des récepteurs de type Toll**

Les récepteurs de type Toll (TLRs) sont la clé des interactions bilatérales entre les neurones et les cellules non-neuronales (Akira et al., 2003). Les TLRs sont exprimés par les cellules immunitaires et gliales afin de réguler l'immunité innée par l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et les voies MAP kinases. Les TLRs sont reconnus pour être activés par

des motifs moléculaires activés par un pathogène (PAMP) ou par un danger (DAMP), des ligands endogènes libérés suite à une lésion tissulaire (Akira et al., 2003). L'activation du TLR4 dans la microglie au niveau de la moelle épinière et des astrocytes, contribuent au développement et au maintien de la douleur nociceptive inflammatoire et neuropathique, en générant une synthèse d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  (Tanga et al., 2005). La sécrétion de ces cytokines interagit avec les voies de la douleur dans la moelle épinière. Les neurones nociceptifs primaires des ganglions spinaux et du ganglion trigéminal expriment aussi les TLRs (Bsibsi et al., 2002). Les TLRs sont exprimés différenciellement dans les neurones sensoriels primaires et modulent de façon différente les fonctions sensorielles. Au niveau des nocicepteurs, le TLR4 est couplé fonctionnellement au canal ionique TRPV1, de sorte que la liaison du lipopolysaccharide (LPS) augmente l'influx de Ca<sup>2+</sup> dans les neurones sensoriels primaires (Diogenes et al., 2011). Contrairement à sa localisation intracellulaire dans les cellules immunitaires, le récepteur TLR7 est aussi exprimé sur la surface cellulaire ainsi que dans les axones des ganglions de la corne dorsale des nocicepteurs. Un ligand endogène du récepteur TLR7 est le miR let-7b qui se lie au motif GUUGUGU (Park et al., 2014), menant à une activation rapide et une excitation des nocicepteurs tout comme une liaison également au canal ionique TRPA1. Le récepteur TLR5 est quant à lui exprimé au niveau des fibres de gros calibres A $\beta$  et activé par la protéine globulaire flagelline d'origine bactérienne, permettant un transport rapide de certaines petites molécules au travers de la membrane neuronale. Ce mécanisme a été exploité entre autres, afin de faciliter le transport de l'anesthésiant QX-314, un bloqueur des canaux sodiques, résultant aux blocages sélectifs des fibres A. Autant que le couplage des TLRs avec des canaux ioniques au niveau des nocicepteurs est important pour l'induction de la douleur aiguë, la signalisation intracellulaire des TLRs des nocicepteurs pour le développement de la douleur chronique suite à une lésion nécessite la signalisation *via* le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), une molécule clé de signalisation intracellulaire (Liu et al., 2014; Park et al., 2014). Donc, les nocicepteurs partagent des propriétés similaires aux cellules immunitaires en exprimant des récepteurs TLRs, des cytokines, des chimokines, et une cascade inflammatoire (Chiu et al., 2012). Grâce au couplage avec des canaux ioniques, les récepteurs TLRs des nocicepteurs agissent comme une classe distincte de récepteur danger dû à sa détection rapide des PAMP et DAMP (Akira et al., 2003). Cette sensibilité des neurones sensoriels primaires au danger va assurer une réponse protectrice telle qu'une réponse rapide au retrait (Chiu et al., 2012) comme



les réponses immunitaires innées et adaptatives *via* la signalisation MyD88, protéine adaptatrice intracellulaire couplé au TLRs des neurones sensoriels (Liu et al., 2014). Cette voie de signalisation évolutive conservée persiste due à sa fonction biologique importante, mais une activité excessive de cette même voie peut aussi mener à des maladies auto-immunes si elle n'est pas contrôlée.

### **1.1.6 Les traitements pharmacologiques de la douleur**

Il y a plusieurs types de traitement pharmacologique disponible pour soulager les douleurs chroniques, ciblant notamment l'inflammation périphérique ou neurogénique (centrale). Parmi les analgésiques les plus prescrits par les praticiens, on retrouve : 1) les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) classiques, les inhibiteurs sélectifs à la COX-2 (coxibs) et les corticostéroïdes ; 2) les analgésiques opioïdes : opioïdes faibles (codéine, tramadol) et opioïdes puissants (morphine, hydromorphone, fentanyl) ; 3) les adjuvants (antidépresseurs, anticonvulsivants, antiarythmiques, myorelaxants, antimigraineux). Les adjuvants ou co-analgésiques sont des médicaments qui sont principalement destinés à un usage autre que l'analgésie, mais qui peuvent avoir un effet anti-nociceptif dans des situations particulières. Ils sont des médicaments administrés en conjonction avec les AINS et les opiacés pour améliorer l'activité analgésique des médicaments, diminuer la dose requise d'opiacés et réduire les effets indésirables. Les anti-inflammatoires sont considérés comme des analgésiques à cause de leur capacité de diminuer les médiateurs de l'inflammation associés au métabolisme de l'AA. Afin de traiter la douleur chronique, ils sont habituellement utilisés en combinaison avec les autres classes de médicaments analgésiques (Barth et al., 2017; Moulin et al., 2007).

Les modulateurs de la sensibilisation périphérique regroupent une variété d'anticonvulsivants, d'antiarythmiques et d'analgésiques topiques ayant la propriété de bloquer les canaux sodiques voltage dépendants de manière non spécifique. La concentration de médicament nécessaire pour bloquer l'activité ectopique est généralement plus faible que celle nécessaire pour bloquer l'activité électrique normale du SN ou du système cardiovasculaire (Colloca et al., 2017; Su et al., 2009). L'activité électrique ectopique est ainsi bloquée sans toutefois bloquer l'activité électrique normale (Mao et al., 2000). Cette fenêtre thérapeutique est essentielle, cependant, dans un contexte clinique, le risque de toxicité est tout de même bien présent (Finnerup et al., 2015). Les anticonvulsivants agissant selon ce mécanisme sont la

carbamazépine, l'oxcarbazépine et le lamotrigine. Parmi les antiarythmiques, il y a la méxiletine et la lidocaïne topique. Les antidépresseurs tricycliques agissent aussi en partie selon ce mécanisme. Les biphosphonates (apoptose des ostéoclastes) et les anti-NGF (anticorps contre le NGF) sont aussi reconnus pour avoir des propriétés analgésiques en périphérie lors de douleurs chroniques osseuses (Moulin et al., 2007).

Les modulateurs de la sensibilisation centrale incluent les bloqueurs des canaux calciques et sodiques voltage-dépendants (sous-unité  $\alpha_2\delta$ ) tels que la gabapentine (un dérivé du GABA) et la prégabaline (PGB) (un analogue du GABA) respectivement, et les antagonistes des récepteurs du GLU de type NMDA comme la kétamine et le dextrométorphan ou l'amantadine (faible antagoniste), et conséquemment, induisant une diminution de neuromédiateurs excitateurs comme la SP et le GLU dans la moelle épinière. Les cannabinoïdes sont aussi reconnus pour atténuer la douleur centrale (Rog et al., 2005).

Les modulateurs des voies inhibitrices englobent les antidépresseurs, les opiacés et l'analgésique atypique tramadol. Les antidépresseurs tricycliques sont, en plus de bloquer les canaux sodiques voltage-dépendants et l'hyperalgésie induite par des agonistes des récepteurs du GLU de type NMDA, inhibiteurs de la recapture de la NA et/ou de la 5-HT, augmentant ainsi leur concentration au niveau des synapses. Ils sont efficaces dans une grande variété d'étiologies de douleur neuropathique, mais ils ont un profil d'effets secondaires peu favorable (McQuay et al., 1996). Les nouveaux antidépresseurs sont mieux tolérés, mais généralement moins efficaces que les tricycliques, les inhibiteurs sélectifs du captage de la sérotonine (ISCS), tel que la fluoxétine et les inhibiteurs de la recapture de la NA et la 5-HT (ICSN), tel que venlafaxine et la duloxétine. Les opiacés inhibent la transmission d'information nociceptive en se liant à leurs récepteurs opioïdiques localisés sur la membrane présynaptique des afférences primaires, postsynaptique des neurones secondaires et sur les interneurons inhibiteurs de la *laminae* II de la substance grise. Le tramadol est un analgésique atypique, il inhibe la recapture de la NA et de la 5-HT et un de ses métabolites primaires est un agoniste des récepteurs opioïdiques (Moulin et al., 2007).

## 1.2 Les neuropeptides

La communication inter-neuronale qui implique de petites molécules non peptidergiques comme l'acétylcholine (ACh), la dopamine (DA), la noradrénaline (NA), ou la sérotonine (5-HT), est un phénomène bien connu en neurobiologie. Le rôle des peptides (neuropeptides) dans le processus fondamental du fonctionnement nerveux reste encore à être mieux exploré.

Les neuropeptides sont présents dans tout le règne animal doté d'un SN. Les neurotransmetteurs peptidiques et les hormones peptidiques, connus spécifiquement sous le nom de neuropeptides, sont nécessaires pour la communication cellule-cellule dans la neurotransmission et pour la régulation des fonctions endocriniennes (Hook et al., 2008; Weindl et al., 1981; Zupanc 1996). Les neuropeptides ont d'abord été isolés à partir d'organes comme l'intestin ou l'hypothalamus du porc (Hook et al., 2008; Weindl et al., 1981; Zupanc 1996), puis peu à peu impliqués dans les fonctions neurobiologiques.

Les neuropeptides font partie d'une catégorie très diverse de médiateurs chimiques de nature peptidique sécrétés par les neurones et ayant fonction de neurotransmetteurs (médiateur impliqué dans le relais de l'information sensorielle) et de neuromodulateurs (médiateur induisant une augmentation ou une diminution de l'excitabilité neuronale). Ils sont constitués d'enchaînements de 3 à 150 résidus d'a.a. et sont jusqu'à 50 fois plus grands que les neurotransmetteurs classiques. Les concentrations de neuropeptides dans le SN sont cependant beaucoup plus faibles que celles des autres neurotransmetteurs.

Même si la SP a été découverte dès 1931 chez le cheval (US et al., 1931), et l'existence de cellules neuronales glandulaires identifiées dans les années 1950 (Scharrer et al., 1954), c'est en 1967 (Bargmann et al., 1967) que les termes neurone peptidergique et synapse peptidergique sont suggérés suite à l'implication des peptides synthétisées à partir de neurones dans la transmission synaptique. C'est surtout depuis les dernières décennies que la recherche se concentre de manière plus intense sur les propriétés fonctionnelles des neuropeptides dans le SNC.

### 1.2.1 Nature chimique

Les neuropeptides contiennent davantage d'information chimique et de sites de reconnaissance pour leurs récepteurs que les neurotransmetteurs à petite molécule. Ils sont en

outre plus petits que les protéines courantes et possèdent une structure tridimensionnelle moins complexe. En fonction de leur origine et de leur composition, les neuropeptides sont classés en familles. On y retrouve notamment les hormones hypothalamiques comme la vasopressine, l'ocytocine ou la SST, les peptides opiacés (endorphines (ENDs)), la famille du neuropeptide Y (NPY), les tachykinines (SP), la famille de la calcitonine (CGRP) ou d'autres familles où l'on retrouve, entre autres, la BK.

La différence d'affinité de liaison entre les neuropeptides et les neurotransmetteurs vis-à-vis de leurs récepteurs est énorme (respectivement nmol/L *versus*  $\mu\text{mol/L}$ ), avec une plus grande sélectivité et moins de copies libérées dans le cas des neuropeptides (Zupanc 1996; Hokfelt et al., 2000; Hokfelt et al., 2003). De plus, les grands neuropeptides diffusent plus lentement à cause de leur encombrement stérique et ils sont moins stables, Pr contre, ils se lient plus solidement à leur (s) récepteur (s) que les petits neurotransmetteurs, ce qui favorise une intervention pharmacologique plus spécifique et donc moins encline aux effets secondaires (Kramer et al., 1998; Tebbe et al., 2005).

Presque tous les neuropeptides sont co-localisés avec un ou deux transmetteurs classiques, une combinaison à l'origine de deux vitesses de communication neuronale : rapide (2-5 millisecondes (ms)) et lente (100-500 ms). Cette dernière pourrait sous-tendre les effets neuromodulateurs du peptide, modifiant l'excitabilité neuronale et régulant la libération et le renouvellement d'autres substances neuroactives (Hokfelt et al., 1978; Hokfelt et al., 1987; Pelletier et al., 1981).

### **1.2.2 Métabolisme : biosynthèse, maturation et régulation**

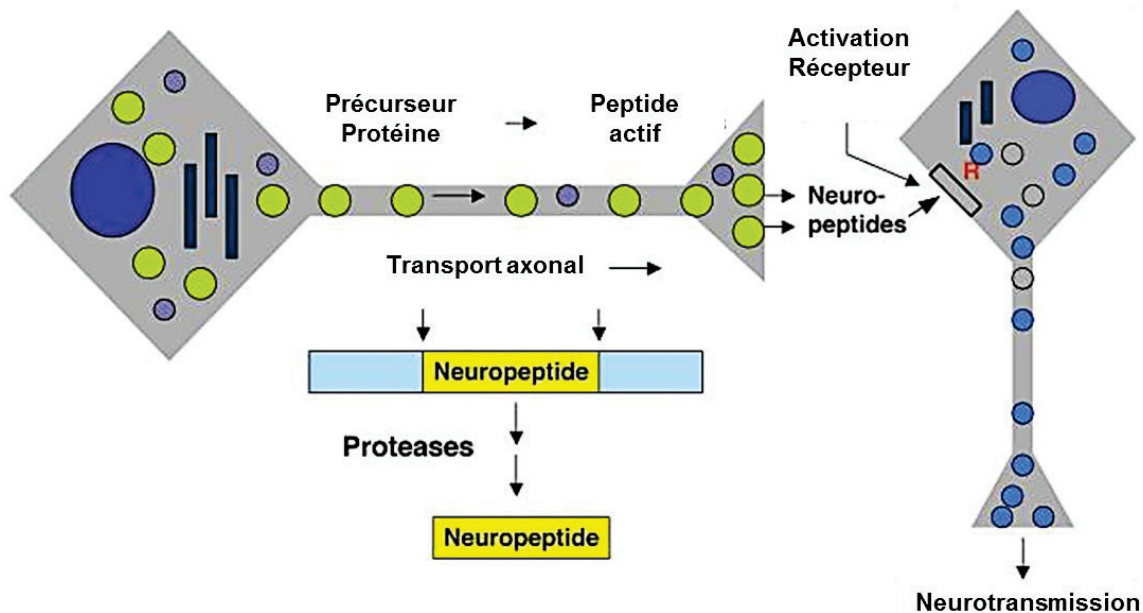
La biosynthèse des neuropeptides est un processus complexe, distinct des neurotransmetteurs classiques, mais dont les étapes initiales sont communes à presque toutes les protéines sécrétées (Hook et al., 2008; Zupanc 1996). Les neuropeptides bioactifs sont générés à partir d'un grand précurseur moléculaire inactif, soit le proneuropeptide d'une longueur d'environ 100-350 résidus, produit au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), donc dans le corps cellulaire du neurone et moindrement dans les dendrites (**Figure 9**).

Les précurseurs peuvent contenir plusieurs copies du même neuropeptide, mais aussi plusieurs peptides différents. Par exemple, la pro-opiomélanocortine donne naissance à la fois à l'adrénocorticotropine et aux  $\beta$ -ENDs. Après clivage d'une séquence signal N-terminal, le

propeptide est transporté vers le réseau *cis*-golgien, puis dans le *trans*-golgien où il est empaqueté dans des vésicules (Perone et al., 1997). Les peptides en cours de maturation sont stockés dans de grandes vésicules à coeur dense (GVCD) ou dans des granules de sécrétion, avec d'autres enzymes protéolytiques de maturation spécifiques (convertases ou protéases) lesquelles coupent les précurseurs pour en extraire les peptides bioactifs (revu dans Stewart & Hall, 1993).

Brièvement, l'étude des protéases qui coupent les sites dibasiques et monobasiques au sein des proneuropeptides pour la maturation a permis d'identifier 2 voies majeurs. La première est la voie de la cystéine protéase pour le traitement de la proenkephaline (ainsi que d'autres proneuropeptides) pour la production du peptide enképhaline opioïde endogène constituée de cathepsine L dans les vésicules sécrétoires. La préférence de la cathepsine L à cliver du côté NH<sub>2</sub>-terminal des sites de traitement des résidus dibasiques produit des intermédiaires peptidiques avec des résidus NH<sub>2</sub>-terminaux, qui sont ensuite éliminés par l'aminopeptidase Arg/Lys afin de produire le neuropeptide. La seconde voie inclue la famille bien établie des protéases proprotéine convertase (PC) 1/3 ou 2 de type subtilisine qui traitent les proneuropeptides, prohormones et autres proprotéines suivie de l'étape Arg/Lys carboxypeptidase (carboxypeptidase de type E ou H) (Hook et al., 2008).

D'importantes modifications post-traductionnelles peuvent se produire ensuite pour obtenir le peptide final, comme la glycosylation, l'acétylation, la phosphorylation, ou encore la sulfatation (Hook et al., 2008; Zupanc 1996). Après utilisation, les neuropeptides sont détruits par des peptidases extracellulaires ou membranaires, puis leur remplacement est assuré par leur synthèse/transport. L'endopeptidase neutre (NEP) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) sont les deux enzymes les plus impliquées dans les processus métaboliques de dégradation dans le SNC et SNP.



**Figure 9. Synthèse d'un neuropeptide lors du transport axonal menant à la neurotransmission.**

La synthèse du précurseur de la protéine (proneuropeptide) a lieu à l'intérieur du corps cellulaire. Tout au long du transport axonal, le proneuropeptide, transporté dans des vésicules (cercles verts), subit une maturation par clivage *via* des protéases jusqu'à la terminaison axonale. Le neuropeptide actif sera libéré par exocytose dans la fente synaptique afin d'activer des récepteurs spécifiques. Figure modifiée et tirée de (Hook et al., 2008).

Les neuropeptides empruntent surtout la voie de la sécrétion régulée, contrairement aux protéines communes qui empruntent la voie de la sécrétion constitutive. Les peptides matures sont transportés dans les GVCD où ils sont très concentrés, et peuvent aussi y être stockés pendant de longues périodes, donnant une réserve disponible de produits sécrétoires matures. Les GVCD sont ensuite acheminées dans les dendrites et l'axone le long du réseau de cytosquelette, retrouvées dans les terminaisons axonales, et leur contenu libéré sur commande dans le milieu extracellulaire (Hook et al., 2008; Zupanc 1996). La libération des neuropeptides se fait par exocytose et peut avoir lieu non seulement depuis les terminaisons nerveuses, mais aussi depuis les dendrites et le soma. Dans les terminaisons nerveuses, on retrouve majoritairement des petites vésicules claires (neurotransmetteurs classiques), mais aussi des GVCD distribuées spécifiquement à distance des spécialisations membranaires synaptiques (complexes de jonction). Cette différence de distribution spatiale des vésicules dans les terminaisons est à la base du mode de libération des neuropeptides. La relâche des GVCD demande en effet une stimulation plus intense que pour les petites vésicules (une fréquence de décharge plus grande et/ou une durée de stimulation plus longue) (Adelson et al., 2009). C'est

ce que l'on appelle la libération différentielle, qui implique un mécanisme de relâche différent pour les GVCD, dans lequel le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle primordial.

Une libération non-synaptique des neuropeptides, tel qu'initialement proposé dans le cas des amines biogènes (Beaudet et al., 1978) est également possible, pouvant ainsi libérer leur contenu à distance des complexes de jonction (Guy et al., 1982; Pelletier et al., 1981; Stroh et al., 1995). Une fois libérés, les neuropeptides peuvent soit agir sur des récepteurs situés sur une interface membranaire postsynaptique, soit diffuser à distance dans le cas d'une libération non-synaptique. D'une manière générale, la fixation d'un peptide sur son récepteur produit une cascade transductionnelle impliquant des seconds messagers intracellulaires du neurone cible et conduisant à une réponse cellulaire.

### **1.2.3 Récepteur des neuropeptides : le récepteur couplé aux protéines G**

Il existe communément plusieurs sous-types de récepteurs pour un neuropeptide donné et il s'agit généralement (plus de 80 %) toujours d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). La structure générale de ces récepteurs comprend sept hélices transmembranaires hydrophobes, avec une queue N-terminale extracellulaire et une queue C-terminale intracellulaire. On y trouve trois boucles cytoplasmiques, dont la troisième est impliquée dans la liaison aux protéines G (pG). Cette pG est composée de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) dont la sous-unité  $\alpha$  liant les nucléotides guanyliques pouvant à son tour moduler l'activité directe des canaux ioniques ( $\text{pG}\alpha_o$ ) ou indirecte d'une enzyme par la synthèse de seconds messagers ; l'AMPc résultant de l'activation de l'adénylate cyclase par la  $\text{pG}\alpha_s$  (la  $\text{pG}\alpha_i$  inhibant cette synthèse) ; l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) (permet une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique) et le diacylglycérol (DAG) (permet une ouverture des canaux calciques membranaires par la PKC) résultant de l'activation de la phospholipase C de type  $\beta$  ( $\text{PLC}\beta$ ) clivant le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate par une  $\text{pG}\alpha_q$ . Les autres trois boucles extracellulaires sont impliquées dans la fixation du ligand. Les RCPG sont retrouvés sur les neurones et abondamment distribués dans le SNC et leur fonction est régulée par un vaste éventail de molécules (Cottrell et al., 2006; Martini et al., 2002; Ferguson 2001).

Contrairement aux neurotransmetteurs classiques, les neuropeptides n'ont pas de système de recapture après leur libération. Dans ces conditions, deux mécanismes fondamentaux assurent la fin du signal, soit la dégradation du peptide ou la désensibilisation du récepteur. La



désensibilisation se définit comme la diminution de l'amplitude des réponses postsynaptiques qui se manifestent si le transmetteur est présent en permanence. Au cours de cette désensibilisation, un découplage fonctionnel (recrutement de protéines bloquant l'interaction pG/récepteur) va être suivi d'une internalisation du complexe ligand/récepteur dans un endosome (endocytose de vésicules recouvertes de clathrine). En bref, la fixation du ligand endogène engendre la phosphorylation d'une portion cytoplasmique du récepteur par une kinase, processus qui augmente l'affinité du récepteur pour la  $\beta$ -arrestine qui elle-même permet le recrutement des effecteurs de l'endocytose (adaptine et clathrine). Suite à l'internalisation, il y a soit dégradation, soit recyclage du récepteur à la membrane créant le phénomène de va-et-vient : désensibilisation-internalisation/recyclage-resensibilisation entre la membrane neuronale et le cytoplasme (Cottrell et al., 2006; Ferguson 2001).

Un RCPG, lorsque situé sur l'extrémité présynaptique (autorécepteur), peut aussi servir de frein à la synthèse/libération du neuropeptide, comme pour le NPY (King et al., 1999).

## **1.2.4 La substance P**

### **1.2.4.1 Biochimie**

La SP appartient à la grande famille des tachykinines, un neuropeptide composé de 11 a.a. (Chang et al., 1971), et est la tachykinine la plus étudiée depuis très longtemps (Chang et al., 1970; US et al., 1931). Les autres membres de cette famille sont les NKA et B (NKB), le neuropeptide  $\kappa$  (NP $\kappa$ ) et le neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ). La SP provient du gène précurseur préprotachykinine-A (PPT-A) (Carter et al., 1990) pouvant induire la synthèse de 3 messagers ARNs ( $\alpha$ PPT-A,  $\beta$ PPT-A,  $\gamma$ PPT-A $\gamma$ ), les 3 codants pour la SP (Carter et al., 1990). Ce gène code aussi pour NKA, NP $\kappa$  et NP $\gamma$ . Il existe aussi un gène PPT-B provenant du même gène ancestral que PPT-A, mais qui ne code que pour la NKB (Carter et al., 1990). La SP est extraite de son précurseur par des PC suite au transport vésiculaire axonal antérograde (Brimijoin et al., 1980) par les sous-types 1 et 2 (PC1/PC2) (Saidi et al., 2015), puis la SP est relâchée dans l'espace extracellulaire suite à une stimulation intense, soit seule, soit en même temps qu'un neurotransmetteur classique. Plusieurs enzymes sont impliquées dans l'inactivation de la SP, limitant sa capacité à activer ses récepteurs ; on retrouve principalement l'enképhalinase (une NEP (Matsas et al., 1984)), mais aussi l'ACE ou bien encore l'acétylcholinestérase (Skidgel et



al., 1987). La NEP est présente principalement dans le cerveau et la moelle épinière tandis que l'ACE dans le plasma et le liquide céphalorachidien (LCR) (Harrison et al., 2001; Matsas et al., 1984; Skidgel et al., 1987). Globalement, ces enzymes clivent la SP de telle sorte qu'elle perd son extrémité carboxyle nécessaire à la fixation au récepteur. Certains des fragments générés, notamment les fragments c-terminaux, suite au clivage de la SP peuvent préserver des activités biologiques (Pailleux et al., 2013).

#### 1.2.4.2 Pharmacologie

Il existe trois classes de récepteurs pour les tachykinines (Hershey et al., 1991) : récepteur neurokinine-1 (rNK-1) ; récepteur neurokinine-2 (rNK-2) et récepteur neurokinine-3 (rNK-3). Ils sont très similaires dans leur séquence en a.a. et sont tous des RCPG (Nakanishi 1991; Mantyh et al., 1995). Les trois récepteurs peuvent lier les différentes tachykinines, mais dans un ordre d'affinité bien précis. La SP a plus d'affinité pour le rNK-1, la NKA pour le rNK-2, et la NKB pour le rNK-3 (Regoli et al., 1994). Le rNK-1 est exprimé en très forte densité dans la *laminae* I (Todd et al., 1998) et moins dans la *laminae* II de la corne dorsale, mais présent également sur certains neurones des *laminae* plus profondes III, IV et V (Littlewood et al., 1995). La stimulation du rNK-1, un RCPG, entraîne une augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  par une transduction du signal assurée par un couplage à la  $pG\alpha_q$  (PLC $\beta$ ) et  $pG\alpha_s$  (AMPC). Ces cascades conduisent non seulement à une réponse électrophysiologique de la cellule cible, mais aussi à la transcription de certains gènes *via* les éléments de réponse CRE/ $Ca^{2+}$  compris dans leur séquence régulatrice (Harrison et al., 2001). Comme de nombreux RCPG, le rNK-1 est sujet à la désensibilisation. Ce récepteur est aussi extrêmement mobile. Il s'internalise rapidement : 60 % des neurones rNK-1 positifs du striatum de rat montrent une forte internalisation du rNK-1 une minute seulement après l'injection de SP (Mantyh et al., 1995), mais celle-ci peut être réversible. Le rNK-1 est aussi sujet au processus de recyclage (Mantyh et al., 1995). Les effets de la SP sont dépendants de sa concentration : une forte concentration favorise l'excitabilité neuronale tandis qu'une faible concentration supporte une inhibition par la stimulation d'opioïdes endogènes (Zubrzycka et al., 2000).

Il existe de nombreuses recherches qui ont été effectuées avec des agonistes (Drapeau et al., 1987) et des antagonistes (Bjorkroth et al., 1982) des récepteurs aux tachykinines, mais en particulier aux rNK-1. Les agonistes ne sont pas spécifiques, mais bien préférentiels à un

récepteur, surtout pour le rNK-1, tout comme les antagonistes. Dans le SNC, l'utilisation d'antagoniste a plutôt été utilisée afin d'inhiber la réponse excitatrice de la SP, mais engendre des effets secondaires neurotoxiques importants. Toutes ces utilisations supportent la notion que les tachykinines sont impliquées dans les mécanismes nociceptifs et qu'elles peuvent moduler la douleur qu'elle soit de type aiguë ou chronique (Otsuka et al., 1993).

#### **1.2.4.3 Physiologie**

Des études ont démontré par immunohistochimie que la SP est localisée dans les neurones du SNC et les tissus périphériques, mais aussi présente dans certaines cellules non neuronales telles que les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires (Kotani et al., 1986). La SP est libérée par les terminaisons nerveuses périphériques et centrales des fibres A $\delta$  et C (Schaible et al., 2005). Elle participe à l'inflammation neurogénique en induisant une vasodilatation et en favorisant la relâche et la production d'autres substances algogènes telles que les kinines et les PGs, mais aussi d'histamine par les mastocytes. L'histamine va stimuler à son tour les fibres afférentes primaires à la périphérie et participer à la vasodilatation et l'œdème (Schaible et al., 2005). Les tachykinines favorisent aussi la formation d'œdème et l'extravasation de protéines plasmatiques. La SP module l'information sensorielle en favorisant une dépolarisation prolongée des terminaisons nerveuses postsynaptiques par une réduction du courant K<sup>+</sup> (Zubrzycka et al., 2000). Au niveau spinal, la SP a un rôle pronociceptif indéniable : les rNK-1 sont aussi présents sur les neurones secondaires des voies de la douleur. Chez la souris, les niveaux d'expression génique du rNK-1 sont augmentés dans la moelle épinière dans un modèle de douleur neuropathique (Taylor et al., 2004). Dans des modèles animaux de douleur arthrosique, les concentrations de SP dans la moelle épinière sont augmentées suite au développement d'inflammation neurogène (Ferland, Pailleux, et al., 2011; Otis et al., 2016; Rialland et al., 2014). La SP qui est libérée par les neurones afférents primaires ne provoque pas à elle seule des décharges nociceptives, mais elle potentialise aussi l'effet du GLU (co-localisation dans les neurones de la moelle épinière) (Battaglia et al., 1988) au niveau du neurone secondaire, suggérant son implication dans le phénomène de la sensibilisation centrale (Latremoliere et al., 2009).

## 1.2.5 Le peptide relié au gène de la calcitonine

### 1.2.5.1 Biochimie

Le CGRP est un neuropeptide de composé de 37 a.a. et il a été découvert par hasard lors de la mise en évidence de l'épissage alternatif du gène CALCA codant pour la calcitonine, désigné comme  $\alpha$ -CGRP (Amara et al., 1982). Peu de temps après, un nouveau gène codant pour un peptide homologue a été découvert, soit le  $\beta$ -CGRP, différant de 1 seul a.a. chez le rat et 3 a.a. chez l'humain et co-localisé avec le  $\alpha$ -CGRP dans les GRD chez le rat (Amara et al., 1985; Noguchi et al., 1990).  $\alpha$ -CGRP et  $\beta$ -CGRP, ainsi que les protéines homologues pro-calcitonine, calcitonine, adrénomédulline, amyline, l'intermédine et les fragments C-terminaux, CGRP<sub>(18-37)</sub> et CGRP<sub>(19-37)</sub>, forment la grande famille des peptides du récepteur de la calcitonine (Becker et al., 2004).

### 1.2.5.2 Pharmacologie

Les rCGRP sont largement présents dans les SNC et SNP (Dennis et al., 1990). C'est l'effet antagonisant du fragment CGRP<sub>(8-37)</sub> qui a permis de définir deux types de rCGRP (Quirion et al., 1992) : le rCGRP<sub>1</sub> étant sensible aux propriétés antagonistes du CGRP<sub>(8-37)</sub>, mais peu sensible aux effets agonistes d'un analogue linéaire, le [Cys (ACM) 2,7] hCGRP $\alpha$  et le rCGRP<sub>2</sub>, beaucoup moins sensible au CGRP<sub>(8-37)</sub>, alors que l'analogue linéaire est agoniste de ce récepteur (Mimeault et al., 1991). Les rCGRP sont couplés à un RCPG, mais de façon atypique. C'est-à-dire que l'activité fonctionnelle du récepteur nécessite l'hétérodimérisation de deux peptides différents (Flahaut et al., 2002), une « *calcitonin receptor-like receptor* » (CRURENT) (Njuki et al., 1993) et une « *receptor activity-modifying protein* » (RAMP) (McLatchie et al., 1998) puis, une troisième molécule, la « *receptor activity-modifying protein* » (Evans et al., 2000) nécessaire à la transduction du signal afin de permettre l'activité de la pG $\alpha_s$  et conséquemment, augmenter les concentrations d'AMPc et éventuellement, de NO. Le CGRP active également des canaux potassiques muscariniques *via* le couplage de son récepteur à des protéines de type pG $\alpha_i$  (Kim 1991). Il existe trois types de RAMPs et l'hétérodimérisation de RAMP1 avec CRLR est associée au rCGRP<sub>1</sub> et ayant une plus grande affinité pour son ligand, le CGRP, tandis que RAMP2 et RAMP3 sont associés à l'activité des récepteurs de l'adrénomédulline ((McLatchie et al., 1998)).

Quant au deuxième récepteur, son clonage n'est toutefois pas encore validé. Par contre, le CGRP a une forte affinité à une faible concentration pour le récepteur de l'amyline de sous-type 1 (Hay et al., 2005). L'hétérodimérisation de ce récepteur se ferait avec une « *calcitonin-receptor protein* » au lieu d'une CRAWL avec RAMPE (Christopoulos et al., 1999). L'interaction du CARPE avec le récepteur de l'amyline de sous-type 1 serait à l'origine de douleur centrale lors d'une migraine (Hay et al., 2017; Hong et al., 2017).

### 1.2.5.3 Physiologie

La co-localisation et la co-libération du CGRP avec la SP dans les fibres nerveuses afférentes supportent un rôle important de ce neuropeptide dans les mécanismes de la douleur périphérique et centrale (Venesio et al., 1987). La distribution du CGRP et de son récepteur est conservée parmi les mammifères (Wimalawansa 1996). Les études immunohistochimiques et d'hybridations *in situ* ont révélé que c'est le  $\alpha$ -CGRP qui est retrouvé au niveau des corps cellulaires des neurones dans les GRD tandis que le  $\beta$ -CGRP est exprimée dans les neurones moteurs et entériques ((Mulderry et al., 1988). Les concentrations les plus élevées de CGRP ont été rapportées majoritairement dans les couches superficielles de la corne dorsale avec une présence légère dans la *laminae V* et très peu dans les lames centrales (Rethelyi et al., 1989). De plus, le CGRP est également présent dans les neurones de second ordre, supportant son rôle en tant que neurotransmetteur (Eftekhari et al., 2013; Lennerz et al., 2008; Mulderry et al., 1988).

En périphérie, chez l'humain, le CGRP est un médiateur majeur dans la dilatation vasculaire, favorisant l'inflammation neurogène lors d'une activation des fibres nerveuses sensorielles (Schmelz et al., 2001), mais inhibant l'œdème causé par certains médiateurs inflammatoires comme l'histamine ou la 5-HT (Raud et al., 1991). Par contre, chez le rat, le CGRP ne provoque pas seulement une vasodilatation et l'extravasation des protéines plasmatiques, mais permet aussi la relâche d'histamine et la dégranulation des mastocytes (Schmelz et al., 2001). En périphérie, le CGRP participe à la sensibilisation des nocicepteurs associée à de l'hyperalgésie, mais ne provoque pas de signal nociceptif seul. Ainsi, un mécanisme par lequel le CGRP augmente l'excitabilité serait indirect *via* entre autres, la stimulation du NGF suite à une augmentation du courant  $\text{Na}^+$  (Kang et al., 2016).

Dans la moelle épinière, le récepteur du CGRP est présent sur les terminaisons nerveuses présynaptiques des neurones glutaminergiques, dont certaines expriment également des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et enképhalinergiques (Marvizon et al., 2007), suggérant la libération de GLU par le CGRP, mais agissant aussi en opposition à l'effet inhibiteur adrénérgerique. Le fait que ces neurones expriment aussi les ENKs est un facteur confondant (Marvizon et al., 2007). L'administration intrathécale (IT) de CGRP ne modifie pas les seuils de réponse à des stimulations nociceptives mécaniques ou thermiques chez des rats normaux, mais l'injection IT de l'antagoniste CGRP<sub>(8-37)</sub> ou d'antisérum CGRP a permis d'élever significativement ces seuils (Yu et al., 1994). Ceci suggère que la libération de CGRP est impliquée dans la sensibilisation centrale plutôt que dans l'induction de la nociception en elle-même.

## 1.2.6 Les peptides opioïdes

### 1.2.6.1 Biochimie

Les interneurons et les neurones de la moelle épinière utilisent, en plus du GABA et de la glycine, des molécules opioïdes endogènes comme neurotransmetteurs et neuromodulateurs afin de moduler négativement la transmission et l'amplification de l'information nociceptive (Bowman et al., 2015; Klee et al., 1976). Ces opioïdes peptides endogènes miment l'action de la morphine et se fixent sur les récepteurs opiacés. Elles appartiennent majoritairement à 3 grandes familles : la proENK à l'origine des met- et leu-ENKs, la pro-opiomélanocortine à l'origine des  $\beta$ -ENDs, la proDYN et la leu-ENK à l'origine des DYNs et des néoENDs et la préproN/FQ codant pour la nociceptine (ou orphanine FQ (N/FQ)) (Kieffer et al., 2002). Les enzymes qui participent à la maturation des peptides opioïdes sont principalement les PC1 et PC2 (Orduna et al., 2016). Il existe aussi d'autres groupes d'opiacés endogènes possédant d'autres précurseurs. Tous ces peptides opioïdes endogènes sont largement distribués dans les structures cérébrales, principalement celles impliquées dans la nociception et au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Chaturvedi 2003). La plus rapportée dans la littérature lors des mécanismes de la douleur est la « *Big DYN*<sub>1-32</sub> » qui est constituée de 32 a.a. et comprend les peptides dérivés DYN (A<sub>1-17</sub>) et DYN (B<sub>20-32</sub>) (Merg et al., 2006).

Les peptides opioïdes endogènes sont inactivés par un mécanisme de dégradation enzymatique dont la NEP (néprilysine) qui coupe la liaison glycine-phénylalanine et l'aminopeptidase N qui hydrolyse la liaison tyrosine-glycine (Roques et al., 1993).

### 1.2.6.2 Pharmacologie

Il existe majoritairement trois sous-types de récepteurs opiacés bien connus à ce jour : le *mu* =  $\mu$  (MOR) (Chen et al., 1993), le *delta* =  $\delta$  (DOR) (Evans et al., 1992) et le *kappa* =  $\kappa$  (KOR) (Minami et al., 1993). Un quatrième membre de la famille des récepteurs opioïdes, le récepteur nociceptine/orphanine FQ (ORL1) a été cloné en 1994 (Mollereau et al., 1994). Les ENKs, les  $\beta$ -ENDs et les DYNs lient préférentiellement les récepteurs  $\delta$ ,  $\mu$  et  $\kappa$  respectivement, mais peuvent aussi lier les autres récepteurs, mais avec une affinité moindre (Chang et al., 1979; Goldstein et al., 1979; Dhawan et al., 1996). Les récepteurs opioïdes appartiennent à la famille des RCPG à 7 domaines transmembranaires de type  $pG_{i/o}$  partageant 60 % d'homologie de séquence entre les trois sous-types, dont les portions les plus similaires sont situées dans les segments transmembranaires et les boucles intracellulaires (Kane et al., 2006). Ils participent au contrôle inhibiteur descendant de la douleur. Ainsi, ils inhibent l'adénylate cyclase, ce qui diminue le contenu intracellulaire en AMPc et conséquemment, la synthèse de NO. Ils permettent aussi l'ouverture des canaux  $K^+$  entraînant une hyperpolarisation cellulaire (au niveau postsynaptique) et ils inhibent l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs, entre autres, au niveau présynaptique (Law et al., 2000). Comme les autres RCPG, les récepteurs opioïdes subissent le processus de désensibilisation-internalisation/recyclage-resensibilisation différemment selon la nature de l'agoniste opioïde et l'endocytose des récepteurs semble prévenir le développement de la tolérance aux opioïdes (Koch et al., 2005; Law et al., 2000).

### 1.2.6.3 Physiologie

Le système opioïde endogène est impliqué à plusieurs niveaux, soit dans la régulation de la douleur et de l'analgésie, la régulation du stress, l'apparition de la tolérance et de la dépendance, l'apprentissage et la mémoire, le sentiment de satiété et la soif, l'abus de drogues, le développement du SNC et du système endocrinien, les troubles de l'humeur, l'activité du système digestif, etc. (Bodnar 2017). Les agonistes des MORs (morphine) bloquent les réponses

aux stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques ou chimiques, mais compte tenu de la grande distribution de ce récepteur sur d'autres systèmes physiologiques, les effets secondaires sont importants. On note surtout la dépression respiratoire, la constipation, la sédation, l'euphorie, la dépendance physique et plusieurs autres (Bodnar 2017).

Au niveau central, l'expression des récepteurs opioïdes est présente dans tout le SNC, mais en particulier, au niveau de la moelle épinière. Son expression est concentrée majoritairement dans les *laminae* II et III des cornes dorsales (Gouarderes et al., 1985), plus spécifiquement dans les GRD qui s'y rattachent (avec alors migration vers les terminaisons périphériques et centrales des neurones afférents primaires). La présence stratégique de ces récepteurs sur les voies impliquées dans la modulation de la douleur, en particulier les voies descendantes inhibitrices, mais aussi sur les voies ascendantes de la douleur, permet l'inhibition de la transmission des impulsions nociceptives à travers la moelle épinière par un mécanisme d'action présynaptique (le plus important) et postsynaptique (Beaulieu P et al., 2005).

Les peptides opioïdes possèdent une action inhibitrice par stimulation des fibres inhibitrices GABAergiques qui bloquent ainsi la libération de SP ou de GLU des neurones nociceptifs au niveau présynaptique et conséquemment, pouvant ainsi moduler d'autres voies descendantes comme les neurones noradrénergiques afin de produire un effet anti-nociceptif. Au niveau postsynaptique, ils produisent leur effet par ouverture des canaux potassiques, conduisant à une hyperpolarisation du neurone. L'ensemble de ces mécanismes au niveau cellulaire produit une réduction de l'excitabilité neuronale et par le fait même, bloque la transmission du signal nociceptif (Beaulieu P et al., 2005). Il a été démontré par immunoréactivité que la DYN est co-localisée avec la SP et le CGRP dans les fibres C peptidergiques, et partiellement avec la présence de GLU (Marvizon et al., 2009). Il a aussi été démontré que les récepteurs MOR et DOR peuvent être exprimés sur les mêmes neurones que la SP et que l'activation de ces récepteurs opioïdes peut interférer avec l'internalisation du rNK1 et par le fait même, diminuer la libération de SP et contribuer à soulager la douleur (Beaudry et al., 2011). En faible concentration, il est rapporté que la SP stimule la sécrétion de peptides opioïdes endogènes (Zubrzycka et al., 2000).

En périphérie, les peptides opioïdes endogènes et leurs récepteurs sont présents dans plusieurs organes ainsi que sur différents types de cellules immunitaires (Labuz et al., 2009; Stein et al., 1989), inhibant la libération, dépendante du  $Ca^{2+}$ , de composés pro-nociceptifs et



pro-inflammatoires à partir des terminaisons sensibles des neurones périphériques. Lors d'une douleur inflammatoire neurogène, une augmentation du transport axonal des récepteurs opioïdes et une expression à la hausse de ces mêmes récepteurs sont observées sur les terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents primaires. Ainsi, dans des conditions de stress ou lors de la libération de cytokines, les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement et être analgésiques. Les récepteurs opioïdes situés sur les cellules immunitaires peuvent supprimer l'activité des lymphocytes et également inhiber la synthèse ou la libération de cytokines (Stein et al., 2001).

#### **1.2.6.4 L'hyperalgésie morphinique**

Les opioïdes endogènes possèdent des propriétés analgésiques propres dans des conditions physiologiques, mais peuvent aussi favoriser le développement d'hyperalgésie dans diverses situations pathologiques. Dans la littérature, il est bien établi que les concentrations de DYNs à l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière sont augmentées lors de douleurs neuropathiques (Kajander et al., 1990) ou inflammatoires (Ruda et al., 1988) pouvant ainsi participer à la sensibilisation centrale. Une co-libération endogène de DYN et de CGRP peut aussi être induite par l'administration d'opioïdes (Gardell et al., 2002). La présence à long terme d'opioïdes dans l'organisme peut induire la libération de SP au niveau des fibres afférentes primaires de type C. Cette libération de SP au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière a été observée dans des états hyperalgiques induits par l'administration d'opioïdes ainsi qu'une augmentation de l'expression de ses récepteurs (rNK1) au niveau des afférences primaires sensorielles (King et al., 2005). L'apparition de cette hyperalgésie a pu être prévenue par l'administration d'un antagoniste rNK1 dans des modèles animaux, mais n'est pas parvenue à induire un niveau de blocage sensoriel suffisant pour produire une analgésie chez l'humain dans des études cliniques (Hill et al., 2000). De plus, dans des conditions pathologiques, il peut y avoir d'importants changements au niveau de la transcription génique suite au phénomène d'hypersensibilisation centrale et générer un couplage des récepteurs opioïdes avec une  $pG\alpha_s$  au lieu d'une activation des effets inhibiteurs de la  $pG\alpha_{i/o}$ , conduisant ainsi à une activation de l'adénylate cyclase au lieu d'une inhibition, mais pouvant être renversé par l'administration de petites doses de naloxone (Tsai et al., 2009). Il peut y avoir aussi la production d'une DYN avec une perte de spécificité et de sélectivité pour les récepteurs opioïdes et pouvant alors activer les



récepteurs NMDA (Massardier et al., 1989). Tous ces changements peuvent participer à l'hyperalgésie morphinique et créant par le fait même, une boucle amplificatrice du phénomène de sensibilisation centrale. Il semble donc que tout comme la SP, les peptides opioïdes endogènes peuvent prendre part à la chronicisation des douleurs (Latremoliere et al., 2009).

## **1.2.7 La bradykinine**

### **1.2.7.1 Biochimie**

La BK est la substance algogène la plus puissante libérée par les tissus lésés. Il s'agit d'un nonapeptide produit par le clivage protéolytique de son précurseur kininogène, soit le kininogène de haut poids moléculaire, par l'enzyme kininogénase (kallibréine) (Bhoola et al., 1992). Cette hydrolyse des kininogènes par les kallibréines libère, selon les espèces, la BK et la kallidine (Lys-BK), peptides actifs du système kinine/kallibréine (Bhoola et al., 1992). Lorsque la BK est inactivée par l'ACE (kininase II) ou la NEP, ceci résulte à la forme inactive BK<sub>1-7</sub>. Par contre, la métabolisation par la kininase I de la BK et de la Lys-BK forme, respectivement, deux métabolites endogènes actifs : des-Arg<sup>9</sup>-BK ou lysl-des-Arg<sup>10</sup>-BK (Negraes et al., 2015).

### **1.2.7.2 Pharmacologie**

La BK peut activer deux RCPGs avec une signalisation intracellulaire des voies classiques (PLC et PLA<sub>2</sub>, NOS) des récepteurs couplés aux pGs en recrutant les pGα<sub>i</sub> et pGα<sub>q</sub> (Takano et al., 2014). Ces deux types de récepteurs ont des caractéristiques distinctes (Marceau et al., 1998). Le récepteur de type B<sub>2</sub> (RB<sub>2</sub>), activé sélectivement par la BK et la Lys-BK, est exprimé de façon ubiquitaire. Le récepteur de type B<sub>1</sub> (RB<sub>1</sub>), est peu détectable dans des conditions physiologiques normales, mais est fortement exprimé dans des situations pathologiques. Il est activé préférentiellement par la des-Arg<sup>9</sup>-BK ou la des-Arg<sup>10</sup>-Lys-BK. L'expression du RB<sub>1</sub> est augmentée dans un contexte inflammatoire et son activation est reconnue pour activer la voie NF-κB (Schanstra et al., 1998). Le RB<sub>2</sub> peut activer directement aussi les enzymes PLC et NOS indépendamment du recrutement d'une pG (Harris et al., 2001).

### **1.2.7.3 Physiologie**

En périphérie, la BK agit principalement comme un médiateur inflammatoire et elle provient des tissus lésés et des éléments sanguins (hématies, leucocytes, plaquettes). Elle joue

un rôle essentiel, par son action synergique avec les autres substances (5-HT, histamine, ions  $K^+$  et  $H^+$ ) aux sites de lésions et d'inflammations. Elle est responsable d'un ensemble de réactions contribuant à la sensibilisation périphérique : libération des autres médiateurs en agissant sur les récepteurs des neurones sensoriels afférents primaires périphériques, potentialisation des effets pro-inflammatoires des cytokines (Meini et al., 2008), vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire. Elle se fixe sur les récepteurs  $RB_1$  et  $RB_2$  des nocicepteurs et les sensibilise aux stimulations nociceptives. Dans des conditions normales, la sensibilisation est provoquée par les  $RB_2$ , mais dans les processus inflammatoires, les  $RB_1$  sont démasqués et leur activation contribue également à l'hyperalgésie. Leurs activations entraînent une élévation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  et la production accrue de PGs, contribuant donc au phénomène douloureux.

Dans le SNC, au niveau de la moelle épinière, la BK est un modulateur de l'excitabilité neuronale *via* la potentialisation de la transmission synaptique glutaminergique pré et postsynaptiques, validant la localisation des récepteurs  $RB_1$  et  $RB_2$  dans les *laminae* superficielles de la corne dorsale afin de participer à l'hyper-sensibilité douloureuse (Wang et al., 2005). Dans un modèle de douleur neuropathique, la DYN active les récepteurs spinaux de la BK, augmentant le  $Ca^{2+}$  intracellulaire et supportant une implication des  $RB_1$  et  $RB_2$  dans la sensibilisation centrale (Lai et al., 2006). Une administration spinale d'agoniste BK est associée à une hyperalgésie thermique pouvant être renversée par des antagonistes des RBs dans un modèle de douleur inflammatoire aiguë (Chapman et al., 1992; Ferreira et al., 2002). Des effets analgésiques d'une injection intra-articulaire (IA) d'antagonistes  $RB_2$  chez des patients atteints d'arthrose supportent un rôle pour la BK dans la douleur inflammatoire neurogène ainsi que dans le phénomène de la sensibilisation centrale (Meini et al., 2008).

## **1.2.8 La somatostatine**

### **1.2.8.1 Biochimie**

La SST est une hormone peptidique reconnue pour ses effets inhibiteurs (Brazeau et al., 1973). La proSST humaine est encodée dans un seul gène (préproSST) qui est exprimé dans les cellules du SNC, des îlots pancréatiques et du tube gastrointestinal (Spiess et al., 1980; Stoller et al., 1989). Ce gène code pour un polypeptide de 92 a.a., précédé d'un peptide signal

de 24 a.a. (Montminy et al., 1984). La proSST possède trois sites de clivage reconnus par les convertases. La maturation s'effectue principalement dans la portion C-terminale de la protéine et génère deux formes bioactives : une première composée de 14 a.a., la SST-14 et la deuxième constituée de 28 a.a., la SST-28 (Patel et al., 1988). Ces deux formes biologiquement actives sont sécrétées par exocytose à partir des vésicules GVCD. SST-14 est la forme prédominante dans le SN alors que la SST-28 est davantage biologiquement active dans le pancréas endocrine (Schally et al., 1980).

### **1.2.8.2 Pharmacologie**

Il existe 5 sous-types de récepteurs à la SST (SSTR1-5). Ils font partie de la famille des RCPGs et ils sont couplés à une  $pG\alpha_i$ , inhibant l'adénylate cyclase (Patel et al., 1994). Les SSTR1-4 ont une faible sélectivité pour le peptide SST-14 tandis que SSTR5 lie préférentiellement la forme SST-28. Certains des sous-types de SSTR sont également couplés à la tyrosine phosphatase (SSTR1-2), des canaux calciques (SSTR2), des échangeurs  $Na^+/H^+$  (Barber et al., 1989), la  $PLA_2$  (SSTR4) (Schweitzer et al., 1990) et des MAP kinases (SSTR2) (Patel et al., 1995). Les mécanismes d'actions de la SST supportent l'hyperpolarisation membranaire neuronale et la diminution de la libération des médiateurs de la douleur.

### **1.2.8.3 Physiologie**

Le rôle de la SST ne se limite pas uniquement à ses effets suite à sa sécrétion par l'hypothalamus (inhibition de l'hormone de croissance, de l'hormone stimulant la thyroïde, la prolactine et l'hormone adrénocorticotrope), mais bien aussi par ses effets inhibiteurs dans le SN.

Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat, la SST est localisée majoritairement dans les lames superficielles (IIo) des axones des fibres afférentes sensorielles et des interneurons (dendrites et terminaisons axonales) conférant un rôle pour la SST dans la modulation des mécanismes de la douleur de la corne dorsale (Alvarez et al., 1990). Ceci est supporté par une augmentation de la relâche dans la moelle épinière de SST suite à une stimulation neuronale électrique périphérique (Morton et al., 1988) et l'administration exogène IT de SST diminue l'excitabilité neuronale, produisant ainsi des effets analgésiques (Gumann et al., 1988).

Au niveau périphérique, dans un modèle d'inflammation neurogène articulaire chez le rat, la SST est augmentée dans la moelle épinière en opposition aux actions inflammatoires de la SP et l'injection IA de SST atténue l'excitabilité neuronale engendrée par les stimulations nociceptives (Heppelmann et al., 1997; Kolasinski et al., 1992). La SST endogène est libérée en périphérie suite à une stimulation antidromique des fibres sensorielles, supportant sa participation aux actions anti-inflammatoires en inhibant la relâche de médiateurs nociceptifs (Szolcsanyi et al., 1998).

## 1.2.9 La transthyrétine

### 1.2.9.1 Biochimie

La TTR a été identifiée en 1942 (Kabat et al., 1942) dans le LCR puis originalement nommée la préalbumine, parce que cette protéine migrait plus rapidement que l'albumine plasmatique sur gel électrophorèse. Puisque la première fonction identifiée de la préalbumine était reliée au **TRAN**Sport de l'hormone **THY**roïde et **RÉTIN**ol, son appellation a été modifiée pour **TRANSTHYRÉTINE**. La TTR a une masse moléculaire d'environ 55 000 Daltons et sa structure cristallographique démontre qu'elle forme un homotétramère (Haupt et al., 1966), c'est-à-dire, une protéine composée de quatre sous-unités identiques d'environ 14 000 daltons chacune (variant de 125 à 150 a.a. dépendamment de l'espèce animale (Larsson et al., 1985; Prapunpoj et al., 2009)). L'homologie de séquence en a.a. est relativement bien conservée avec plus de 83 % des a.a. du rat qui sont identiques à ceux de l'humain (Hennebry 2009). La structure de la TTR contient 8 feuillets  $\beta$  (environ 45 % de la structure) disposés sur deux plans contribuant à la stabilité de cette protéine globulaire et une courte hélice  $\alpha$  (5 %) et la taille totale de la structure quaternaire est de 70 Å x 55 Å x 50 Å (Blake et al., 1978; Pettersson et al., 1987). *In vivo*, on retrouve majoritairement la forme tétramère et très peu de monomère (Blake et al., 1978). La TTR est synthétisée à partir du gène de la TTR localisé sur le chromosome 18 pour l'humain (Wallace et al., 1985). Le processus d'oligomérisation nécessite le clivage d'un peptide signal (les premiers 20 a.a.) pour que la translocation du monomère s'effectue vers la lumière du réticulum endoplasmique, où la dimérisation a lieu (Gaetani et al., 2002; Alshehri et al., 2015).

### **1.2.9.2 Pharmacologie**

Au niveau sanguin, la TTR est bien connue comme étant une protéine de transport de par sa liaison avec la thyroxine (Woeber et al., 1968) et le rétinol (Noy et al., 1992). Au niveau hépatique, la TTR lie le récepteur associé à la protéine sensible au récepteur pour son internalisation (Sousa et al., 2001) et au niveau des astrocytes, la TTR lie avec une forte affinité un récepteur afin de permettre la livraison de la thyroxine (Divino et al., 1990). Au niveau du SN, la TTR peut aussi lier un récepteur sur les cellules épendymaires (cellules gliales) pour son internalisation (Kuchler-Bopp et al., 2000). Pour son implication dans la régénération neuronale, la TTR peut être internalisée dans les GRDs de façon mégaline dépendante (Fleming, Mar, et al., 2009) et de la même manière sur les oligodendrocytes (formation de la gaine de myéline) (Wicher et al., 2006). TTR se fixe aussi à RAGE (récepteur des produits fin de glycation des protéines), un membre de molécule de la surface cellulaire de la superfamille des immunoglobulines. Cette liaison induit l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B induisant une série de cascades d'évènements inflammatoires, immunitaires et de proliférations cellulaires ou apoptotiques (Sousa et al., 2000). D'un autre côté, l'activité protéolytique de la TTR lui confère la capacité de lier des substrats et d'agir comme une peptidase. En effet, la TTR clive le NPY dans le SNC, affectant la croissance des axones (Liz et al., 2009).

### **1.2.9.3 Physiologie**

La TTR sanguine est synthétisée principalement par le foie tandis que la TTR qui est sécrétée dans le LCR provient d'une synthèse par les cellules nerveuses épithéliales du plexus choroïde (Dickson et al., 1985; Soprano et al., 1985). Au niveau du SNC, la présence de la TTR a été récemment identifiée par immunohistochimie dans des cellules neuronales de l'hippocampe et des cellules embryonnaires du cortex en culture primaire puis sa synthèse validité par amplification en temps réel de son ARNm (Li et al., 2011). Une amplification de l'ARNm de la TTR a aussi été réalisée et confirmée dans les GRD et le nerf sciatique des cellules neuronales murines (Murakami et al., 2010), supportant la TTR comme un neuropeptide. Au niveau du SNP, la synthèse de la TTR a aussi été identifiée dans les cellules de Schwann (Murakami et al., 2010).

Une diminution de la concentration de TTR dans le sérum chez l'humain est un marqueur de malnutrition (Guerra et al., 2009). La présence d'ARNm dans le cerveau de la TTR lui

confère aussi des rôles dans les fonctions neurobiologiques (Soprano et al., 1985). Plusieurs mutations de la TTR sont associées à une maladie héréditaire rare : les neuropathies amyloïdes familiales. Cette modification génétique a pour conséquence la formation de dépôts anormaux de substance amyloïdotoxique dans les tissus (SNP et végétatif) et organes qui altéreront leurs fonctions (rein et cœur) (Pitkanen et al., 1984). Les mutations de la TTR ont également été reconnues dans des maladies chroniques et dégénératives telles que l'Alzheimer, le Parkinson, la Schizophrénie et la dépression (Fleming, Nunes, et al., 2009), lui conférant dans des conditions normales des propriétés neuroprotectrices.

Dans un modèle de douleur chronique de lésions de la moelle épinière, les concentrations de TTR dans la moelle épinière sont 3 fois plus petites dans les rats souffrants de douleur aiguë (quantification 8 heures post-induction) comparativement aux rats sham (Afjehi-Sadat et al., 2010), mais contrairement aux concentrations sanguines augmentées de la TTR après 5 semaines dans un modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Bellei et al., 2017). Ce même profil de diminution en TTR sanguin a été observé chez l'humain quelques heures après une intervention chirurgicale (Fricova et al., 2010), mais s'est avéré augmenté chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Ni et al., 2013). Chez des souris déficientes en TTR, on note une augmentation de l'expression de l'enzyme monooxygénase peptidylglycine dans le SNP et SNC, et conséquemment, une augmentation de la concentration de 2 fois du NPY au niveau de l'hippocampe et du GRD du nerf sciatique et associée aussi à une augmentation concomitante de 1,5 fois en SP, en comparaison avec des souris sauvages (Nunes et al., 2006), conférant à la TTR des propriétés neuromodulatrices. Des analyses morphométriques et électrophysiologiques de souris déficientes en TTR suite à une ligation du nerf sciatique, montrent une incapacité de régénération neuronale, comparativement aux souris sauvages, supportant un rôle bénéfique de la TTR dans la régénérescence neuronale (Fleming et al., 2007). *In vivo*, un effet anti-inflammatoire endogène de la TTR a été observé dans le sérum par l'inhibition de la production constitutive d'IL-1 $\beta$  par les cellules endothéliales et confirmé *in vitro*, par la capacité de la TTR à inhiber la libération de cette cytokine des monocytes suite à une stimulation par l'endotoxine pyrogène, le LPS (Borish et al., 1992). Il ne fait pas de doute qu'il faut considérer un amalgame de plusieurs systèmes (nerveux, immunitaire et inflammatoire) pour une étude de la régulation de la TTR et son implication comme neuropeptide et neuromodulateur.

## 1.3 Biomarqueurs et l'étude des -omiques

### 1.3.1 Généralités

Actuellement, dans le domaine de la douleur, l'un des défis majeurs est d'utiliser des biomarqueurs afin de caractériser (identification protéique) et quantifier la douleur. Un biomarqueur (le condensé de marqueurs biologiques) est défini comme une caractéristique qui peut être mesurée objectivement comme un indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathologique ou comme une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (Biomarkers Definitions Working 2001). Les biomarqueurs reflètent un état physiologique de la cellule à un moment spécifique : c'est la signature moléculaire. En plus d'être une réponse physiologique (fréquence cardiaque et respiratoire, pression artérielle, température corporelle, etc.), les biomarqueurs peuvent aussi être moléculaires (enzymes, macromolécules, protéines, neuropeptides, microARNs) (Steinberg et al., 2016). Parmi ceux-ci, l'étude du domaine des -omiques des marqueurs biologiques moléculaires sont les plus prometteurs, car ils bénéficient des innovations technologiques en génomique, protéomique et métabolomique. Ils peuvent être classés, selon quatre grandes catégories :

- L'ADN (génomique) : la cartographie du génome humain a servi de base au développement de plusieurs types d'analyses comme les prédispositions génétiques et les mutations génétiques. Dans la douleur, 60 % de la variabilité de la réponse est attribuable à la génétique (Brown 2016).
- L'ARN (transcriptomique) : son hybridation sur puce à ADN permet une analyse comparative par rapport à un profil sain du transcriptome (total des ARNs présents). Malgré le plein essor de l'épigénétique afin de cibler des microARNs comme biomarqueur de la douleur (Ligon et al., 2016), cette méthode ne permet pas d'identifier les formes actives des protéines et de déterminer leurs niveaux d'expression.
- Les protéines (protéomique) : leur utilisation permet à un instant donné de visualiser l'ensemble des éléments fonctionnels (Schulte et al., 2005).
- Les petites molécules (métabolomique) : elles regroupent les métabolites, les hormones, ainsi que toute autre molécule organique et inorganique présente dans un organisme. La métabolomique permet l'étude des métabolites actifs (Fernie et al., 2004).

Le terme protéomique est utilisé pour désigner l'étude du protéome, c'est-à-dire, de l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organite, d'un tissu, d'un organe, d'un fluide biologique (liquide synovial, sérum, sang, urine, LCR) ou d'un organisme exprimé par un génome à un moment précis et dans des conditions données, permettant de comprendre davantage les maladies et l'implication des cascades d'évènements menant au phénomène de la douleur. En neurosciences, afin de faire référence à l'étude des protéines du SNC et SNP, on utilise le terme neuroprotéomique. La neuroprotéomique est une méthode utilisée pour comprendre majoritairement la pathogénèse d'une vaste gamme de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington, les maladies à prions (Nayak et al., 2015) et en neuropsychiatrie (English et al., 2011) pour la démence, la schizophrénie, la dépression, le suicide et la dépendance aux drogues (Lull et al., 2010).

Pour la quantification des protéines, de nombreuses techniques ont été largement développées, mais les plus populaires sont l'immunodosage (enzymatique ou radio) et l'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'étude de la protéomique bien que l'immunohistochimie permette aussi une quantification neuropeptidique, mais moins spécifique et fiable (Costa et al., 2016). L'immunodosage a longtemps été considéré la méthode de choix pour la bioanalyse (Curtis et al., 1978), ceci étant lié à leur facilité de mise en œuvre, le faible coût d'analyse et le haut débit associé à cette technique. Cependant, la présence d'une molécule possédant un épitope semblable à l'épitope de l'antigène à analyser peut entraîner une réaction avec l'anticorps utilisé et induire des sur- ou sous-estimation de la concentration (Curtis et al., 1978). Malgré une très forte sensibilité et une facilité d'exécution, les immunodosages ne permettent pas d'identifier formellement et sans ambiguïté le composé qui est analysé. La spécificité des anticorps utilisés ne permet pas toujours d'éliminer les réactions croisées avec des molécules interférentes (Boscato et al., 1986). Il est alors nécessaire de se tourner vers des techniques alternatives permettant d'identifier les protéines d'intérêts.

Parmi ces techniques, la spectrométrie de masse est un outil en plein essor pour la quantification des protéines, car elle présente un gain en spécificité et en sensibilité (Pan et al., 2009). Déjà largement utilisée pour la quantification de petites molécules en métabolomique (Fernie et al., 2004), elle tend à se développer pour l'analyse des protéines comme biomarqueurs en neurosciences tant au niveau des matrices biologiques du SN (Moghieb et al., 2016; Pailleux



et al., 2014) que pour le dosage des neuropeptides sanguins (Johnsen et al., 2015). La spectrométrie de masse est très sensible et peut donc être utilisée pour des molécules de faibles concentrations (attomole) (Hou et al., 2012). Elle a également la capacité d'identifier des composés à travers l'élucidation de leur structure chimique par spectrométrie de masse en tandem et la détermination de leur masse exacte. Les approches standards font appel à des techniques de séparation des protéines à l'aide de l'électrophorèse sur gel uni- ou bidimensionnelle ou bien capillaire, des puces à protéines ou de la chromatographie en phase liquide à haute performance bi- ou multidimensionnelle, pouvant être couplée à la spectrométrie de masse (Wu et al., 2006). Les nouvelles conditions d'ionisation par désorption ont considérablement élargi le nombre de composés analysables. Elle offre aujourd'hui la possibilité d'analyser des biopolymères naturels, protéines, oligonucléotides ou polysaccharides : l'enchaînement en acides aminés, en nucléotides, ou en monosaccharides peut ainsi être déchiffré, et les interactions inter- et intra- moléculaires caractérisées dans le cas d'associations supramoléculaires lui ont valu un prix Nobel de chimie en 2002 (Tabet et al., 2003) avec la résonance magnétique. La chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse permet également une quantification relative d'un neuropeptide cible par abondance isotopique incluant un étalon interne stable. Cette méthode est très reproductible et précise (Pailleux and Beaudry 2012).

En plus du vaste éventail de méthodes qualitatives et quantitatives disponibles pour évaluer l'intensité de la douleur et de l'imagerie cérébrale, la douleur peut aussi se quantifier en analysant les variations de concentrations de neuropeptides. En effet, les modifications protéiques (sur- ou sous- expression) dans le SN (LCR, moelle épinière, ganglions rachidiens) étant relativement rapide, la quantification de biomarqueurs neurogènes tels que les neuropeptides, devient un indicateur informatif important de l'activité neuronale qui survient lors de la progression temporelle de la douleur comme il est le cas dans une douleur chronique associée à l'arthrose (Poole et al., 2010). La quantification de ces protéines est alors corrélée à des évaluations fonctionnelles de la douleur afin d'augmenter la validité des méthodes de mesures.

### **1.3.2 L'identification et la quantification protéique dans la douleur chronique**

En recherche expérimentale, la protéomique permet d'identifier des protéines dont l'abondance est modulée suite à l'induction d'un modèle animal de la douleur en comparaison avec le protéome d'un animal sain, proposant ainsi des biomarqueurs potentiels (diagnostiques ou cibles pharmacologiques) de la douleur. Par exemple, dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat par compression chronique des ganglions, l'analyse par protéomique a permis d'identifier dans les GRD, une augmentation significative de la concentration de la PKC epsilon et de l'annexine A<sub>2</sub> puis validée par une augmentation de l'expression génique de ces mêmes gènes en comparaison avec des rats normaux (Zhang et al., 2008). Cette approche non ciblée est intéressante afin d'élucider les mécanismes sous-jacents de la douleur puisque l'inhibition de la translocation de la protéine kinase C epsilon s'est montrée augmentée dans les neurones sensoriels suite à un traitement pharmacologique combiné de la gabapentine et d'un AINS (Vellani et al., 2017). Les profils obtenus dans la régulation des protéines pour l'approche non ciblée diffèrent selon certains paramètres comme le tissu, le fluide ou le modèle animal (Craft et al., 2013). Le défi reste toujours la translation d'une approche plus ciblée vers l'humain des résultats obtenus sur les modèles animaux pour une application clinique de ces biomarqueurs potentiels et ce type d'étude commence à voir le jour. En effet, dans un modèle de douleur de lésion de la moelle épinière chez le rat, un profil différent a été élaboré pour des candidats potentiels de biomarqueurs de la douleur avec une modification de l'expression de 22 protéines dont la régulation de 4 protéines (transferrine, cathepsine D, triosephosphate isomerase 1 et la phosphoprotéine enrichie en astrocytes 15) a aussi été augmentée dans le LCR de patients humains souffrants de lésions à la moelle épinière, supportant ici une application clinique et concrète des découvertes expérimentales par l'utilisation de la protéomique (Moghieb et al., 2016). L'identification d'un nouveau candidat comme neuropeptide et biomarqueur de la douleur, la protéine [des-Ser1]-cerebelline, a été identifiée dans la corne dorsale de la moelle épinière de souris saine par spectrométrie de masse. Par immunohistochimie, la [des-Ser1]-cerebelline s'est avéré colocalisée avec la calbindine, un marqueur d'interneurones excitatrices (Freund et al., 1991). L'injection IT de cette protéine a induit une réponse dose-dépendante d'hypersensibilité mécanique supportant un rôle de neuromodulateur (Su et al., 2014). Cette étude a simultanément identifié la présence lors de l'extraction du segment de la moelle épinière

par des solvants organiques, du CGRP, la galanine, du NPY, des opioïdes endogènes et plus de 32 autres précurseurs de neuropeptides.

La protéomique est aussi utile afin de caractériser des changements structurels articulaires associés à la douleur dans un modèle animal d'induction chirurgicale d'arthrose. On note des modifications dans la régulation de protéines impliquées au niveau de plusieurs mécanismes, comme la glycolyse et la production d'énergie (la kinase nucléoside diphosphate et la purine nucléoside phosphorylase), de la matrice du cartilage (précurseur de chaîne de collagène alpha-1), de la transcription et la synthèse protéique (facteur 1 d'élongation alpha-1 et la protéine DJ-1), de la transduction du signal (calmoduline et la protéine de liaison phosphatidylethanolamine 1), du transport (albumine et la sous-unité alpha de l'hémoglobuline) (Parra-Torres et al., 2014). Parmi ces protéines, la calmoduline est reconnue pour son complexe avec le calcium dans la potentialisation à long terme du récepteur NMDA (Aow et al., 2015) dans la plasticité neuronale. Pour des patients souffrants de douleur chronique associée à l'arthrose, l'analyse protéomique du LCR a révélé une augmentation de la régulation de la cystatine C modulée par une sous-régulation de la MMP-9 (Guo et al., 2014), une protéine impliquée dans la douleur inflammatoire neurogène *via* une activation de la production d'IL-1 $\beta$  et de la microglie (Kawasaki et al., 2008).

La protéomique peut également être utile afin d'identifier et quantifier des changements protéiques au niveau des synapses suite à une administration de morphine (étude du morphinome) et ainsi identifier des cibles spécifiques pour le développement de nouvelles thérapies dans le traitement de la douleur chronique (Stockton et al., 2014). En effet, la plasticité neuronale de souris déficientes pour l'enzyme de conversion en endothéline-2 peut aussi être étudiée par protéomique, permettant ainsi d'identifier les mécanismes supportant une tolérance à une administration de morphine. L'absence d'identification de Leu-ENK comparativement à sa présence, avec Met-ENK, NKA, NKB et la CCK dans la moelle épinière de souris sauvages, supporte une altération au niveau de l'expression neuropeptidique du système opioïde endogène par cette enzyme (Miller et al., 2011). Pendant l'analyse de l'abondance relative des neuropeptides pour des souris sauvages, cette étude a aussi identifié conjointement par spectrométrie de masse la présence de plusieurs autres neuropeptides, telles que la SST, la sécrétogranine ou d'autres peptides (voir l'article complet).

En plus de permettre l'identification de protéines, la protéomique par spectrométrie de masse est une méthode de quantification directe, précise et fiable de neuropeptides cibles, de ses précurseurs ou bien des enzymes participant à leur maturation, présents dans le SN suite à un processus douloureux (Pailleux et al., 2014). La quantification par spectrométrie de masse dans les modèles animaux de douleur chronique permet un lien avec les comportements douloureux augmentant ainsi la validité et la robustesse des résultats des mesures fonctionnelles de la douleur (Ferland, Pailleux, et al., 2011). Une implication de la SP et des tachykinines dans la sensibilité thermique de souris déficientes au gène du récepteur vanilloïde a été mise en évidence suite à l'application de la protéomique (Pailleux, Lemoine, et al., 2012). Dans un modèle de douleur inflammatoire neurogène, les concentrations de la SP et de CGRP quantifiées temporellement par protéomique sont augmentées contrairement à celle de la DYN<sub>1-32</sub> (Ferland, Pailleux, et al., 2011). La mise en évidence par la spectrométrie de masse de la quantification des métabolites actifs de la SP (Saidi et al., 2016) et des tachykinines (Pailleux et al., 2013) de même que les enzymes de maturations de la DYN (Orduna et al., 2016) dans la moelle épinière, participent tous au raffinement de la compréhension des mécanismes douloureux et des cibles pharmacologiques potentielles. Ces études supportent l'utilisation de la protéomique dans les modèles animaux permettant une meilleure validation des méthodes d'évaluation de la douleur.

## **1.4 Modèles expérimentaux de la douleur animale**

### **1.4.1 Généralités**

L'utilisation des animaux en recherche est un sujet fort controversé et plusieurs pays ont donc adopté une réglementation qui permet d'appliquer des principes et des règles d'éthiques par le biais de comités. Au Canada, toute personne qui désire utiliser des animaux en recherche doit suivre les lignes directrices du conseil Canadien de la protection des animaux (CCPA). Le CCPA est l'un des organismes qui est responsable de la surveillance, du soin, et de l'utilisation des animaux utilisés en expérimentation. De plus, chaque établissement de recherche doit avoir son comité de protection des animaux responsable de faire la révision éthique des protocoles proposés et veiller à respecter, tout comme les chercheurs qui conçoivent l'étude, le principe des **3R** : **R**emplacement des études employant des animaux au profit d'autres méthodes lorsque

cela est possible ; **R**éduction du nombre d'animaux utilisés ; **R**affinement des procédures et protocoles pour minimiser les souffrances et maximiser la valeur des résultats.

Globalement, un modèle comportemental de la douleur doit pouvoir respecter des caractéristiques fondamentales et certains de ces paramètres peuvent influencer la réponse comportementale de l'animal et l'interprétation qu'on fait des résultats obtenus (Chesler et al., 2003; Mogil 2017; Klinck et al., 2017):

1. Le modèle doit pouvoir permettre de différencier les réponses aux stimuli nociceptifs de celles non nociceptifs.
2. Le stimulus doit être nociceptif, quantifiable et non invasif.
3. La réponse doit pouvoir être mesurée et ce paramètre doit pouvoir être corrélé à l'intensité de la stimulation dans une plage raisonnable, qui s'étend du seuil de la douleur au seuil de tolérance à la douleur.
4. Les paramètres mesurables doivent être efficaces et traduisibles.
5. Le modèle doit être sensible aux manipulations, notamment pharmacologiques, qui atténuent la perception douloureuse de façon spécifique.
6. Le modèle doit permettre de différencier les modifications non spécifiques du comportement (liées à la motricité, l'attention, etc.) de celles qui sont déclenchées par le stimulus nociceptif proprement dit.
7. La nature physique du stimulus et le site où il sera appliqué. La répétition du stimulus ne doit pas provoquer de lésions.
8. Les résultats obtenus avec un test doivent être reproductibles non seulement au sein d'un même laboratoire, mais aussi entre différents laboratoires.
9. Le manipulateur a beaucoup d'influence sur la réponse des animaux.

Clairement, une seule espèce animale ne remplit pas tous ces critères et chacune comporte des avantages et des inconvénients potentiels. Il est donc important d'être conscient des grandes différences génétiques présentes entre les humains et les diverses espèces animales qui peuvent altérer la pathologie de la maladie et la validité translationnelle des résultats (Wehling 2011).

## 1.4.2 Les différents modèles de douleur

L'un des modèles le plus largement reconnu est celui de la constriction chronique du nerf sciatique, le modèle de Bennett (Bennett et al., 1988). Certains modèles de douleur ont été développés chez les primates (Vierboom et al., 2017), les chiens (Moreau et al., 2014) et chats (Guillot et al., 2013; Guillot et al., 2014), les lapins (Mwale et al., 2011) et d'autres grands mammifères, mais les chercheurs utilisent majoritairement les rongeurs (rats, souris et moindrement le cochon d'inde) comme espèce animale dans leurs études expérimentales. Cependant, l'utilisation d'invertébrés, tel que le poisson zèbre (Gonzalez-Nunez et al., 2009), les mouches à fruits (*Drosophila sp.*) (Milinkeviciute et al., 2012) et les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) (Way et al., 1989) peuvent être avantageux pour les études sur les mécanismes moléculaires et génétiques de douleur aiguë et chronique. Les souris sont utilisées surtout pour des modèles avec des modifications génétiques résultant en une mutation qui empêche, prévient ou modifie l'expression d'un gène et éventuellement, d'une modification de la fonction d'une protéine cible (Marics et al., 2014).

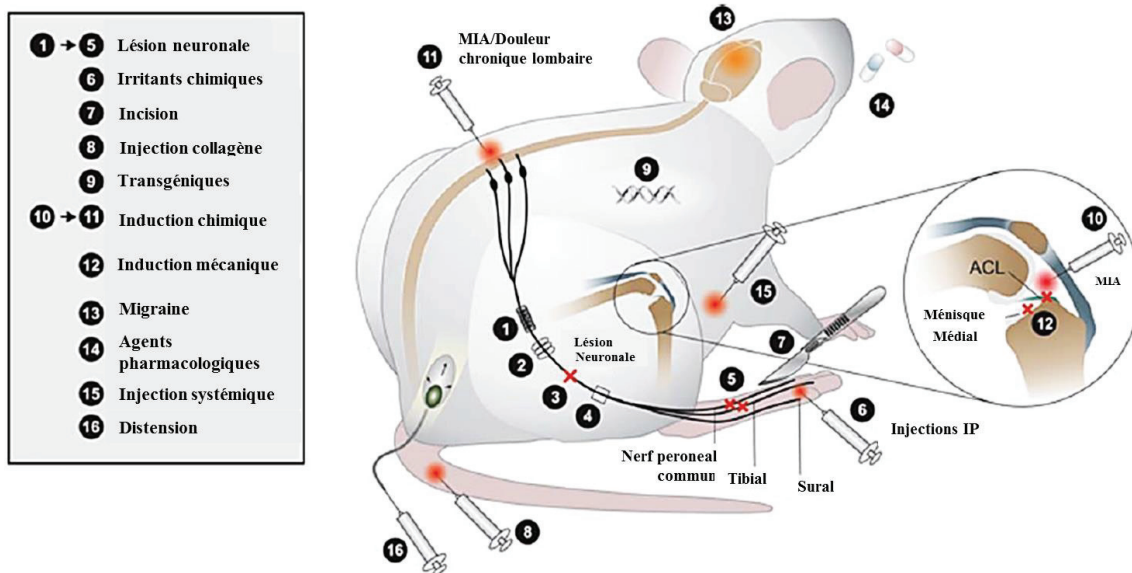
Chaque organisme confère un avantage distinct pour l'étude de la douleur par exemple, la complexité comportementale du rat permet d'analyser les composantes affectives de la douleur (Johansen et al., 2001) ou l'expression faciale par une échelle de grimace (Sotocinal et al., 2011). Il n'y a pas un organisme qui est meilleur qu'un autre pour l'étude de la douleur, mais c'est plutôt l'utilisation de différents organismes qui a contribué à l'élaboration et l'intégration d'une large gamme de connaissance moléculaire, génétique, cellulaire et comportementale dans des processus normaux ou pathologiques de la douleur dans le SN.

Dans les modèles animaux de la douleur, il y a habituellement le développement d'un comportement nociceptif, de l'hypersensibilité mécanique, de l'hyperalgésie et de l'allodynie primaire et secondaire. Ce sont les modifications de ces paramètres que les chercheurs tentent de quantifier, avec différents outils d'évaluation, de façon subjective et objective, en présence ou non d'un traitement pharmacologique spécifique. Cette mesure de la douleur se doit d'être le plus répétable, reproductible et sensible possible tout en minimisant la variabilité et les biais extérieurs.

#### 1.4.2.1 Modèles expérimentaux de douleur inflammatoire neurogène et articulaire

En plus des dommages directs aux nerfs ou leur dégénérescence, la douleur chronique peut résulter d'une inflammation persistante. Une vaste gamme de médiateurs inflammatoires est libérée après une blessure, conduisant à une sensibilisation périphérique et centrale (Ji et al., 2014).

Les événements inflammatoires qui en résultent permettent d'aider à la guérison des tissus, mais dans certaines circonstances, l'inflammation aiguë initiale peut persister et se développer en douleur inflammatoire chronique. Les réponses inflammatoires locales sont majoritairement modélisées chez les animaux (**Figure 10**) par injection intraplantaire d'un irritant chimique, comme le formol (Murray et al., 1988), l'adjuvant complet de Freund (CFA) (Stein et al., 1988) ou la carraghénine (Martin et al., 1984). Chaque irritant chimique produit un temps unique de la réponse nociceptive allant de quelques minutes (*e.g.*, formol) à des semaines (*e.g.*, CFA) et induit à la fois une hyperalgésie et une allodynie thermique et mécanique, permettant des études à court ou à long terme de l'inflammation locale.



**Figure 10. Modèles animaux pour l'étude de la douleur.**

Plusieurs modèles animaux sont disponibles pour étudier la douleur chronique. La douleur neuropathique est communément étudiée suite à une lésion neuronale (1-5) causée par une ligation partielle du nerf sciatique (1), d'une lésion par constriction chronique (2), d'une lésion périphérique neuronale (3), d'une coupure du nerf sciatique (4), ou d'une lésion d'un nerf secondaire (5). La douleur inflammatoire est classiquement modélisée par l'injection intraplantaire d'irritants chimiques (6). La douleur post-opératoire par une incision aiguë au niveau de la surface plantaire (7) ou de la queue. La douleur articulaire est reproduite, dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, par l'injection de collagène (8) ou par un modèle spontané avec des animaux transgéniques (9). La douleur articulaire est induite chimiquement par injection intra-articulaire (10) dans le genou pour la douleur associée à l'arthrose ou dans les facettes lombaires (11) pour la douleur chronique (11) lombaire. L'arthrose peut être aussi provoquée mécaniquement par chirurgie par transection ligamentaire et déstabilisation du ménisque médial (12). La douleur liée à une migraine (13) est modélisée par une vasodilatation crâniale ou par une stimulation prolongée des zones directement innervées par le nerf trijumeau. L'administration orale (14) ou systémique (15) d'agents pharmacologiques pour le traitement de pathologies comme un cancer (chimiothérapie) ou une thérapie anti-virale peut causer de la douleur pour être modélisée. La distension colorectale a été développée afin d'étudier plusieurs syndromes de douleur viscérale (16). Monosodium iodoacétate (MIA), intra-plantaire (IP), ligament croisé antérieur (ACL), virus de l'immunodéficience humaine (HIV). Figure modifiée et tirée de (Burma et al., 2016).

Les modèles animaux de la douleur sont également utilisés lorsqu'une inflammation persiste dans les articulations entraînant des douleurs chroniques comme dans la maladie auto-immune de l'arthrite rhumatoïde (RA). Il est possible d'induire la RA par une injection de collagène (Myers et al., 1997) ou par un modèle spontané chez la souris transgénique K/BxN (Monach et al., 2007). Ces modèles ont conduit à une meilleure compréhension du développement de la RA et à la mise en marché de nouveaux traitements ciblant les cytokines (van den Berg et al., 1994) ou agissant directement sur les lymphocytes B (Edwards et al., 2004), supprimant ainsi l'adaptation des voies immunitaires.



Une douleur chronique d'origine inflammatoire est aussi présente dans la pathologie de l'arthrose. Les modèles animaux sont capables de mimer de façon précise la dégradation du cartilage articulaire dans le temps, qui est souvent le résultat d'un traumatisme, d'une infection ou d'une maladie (Alshami 2014). Les modèles induits par la chirurgie simulent de près le syndrome clinique post-traumatique de l'arthrose dans lequel une transection du ligament croisé crânial (antérieur pour l'humain bipède) (modèle de Pond-Nuki) (Pond et al., 1973) ou une déchirure du ménisque médial (Patchornik et al., 2012) ou la combinaison de ces 2 interventions chirurgicales (Kim et al., 2016) peuvent provoquer une déstabilisation du genou, altérant le support de charge et conséquemment, engendrant le développement d'une douleur analogue à celle de l'arthrose (Patchornik et al., 2012; Pond et al., 1973). Par contre, le niveau d'atteinte des lésions articulaires n'est pas toujours relié à l'intensité de l'expérience douloureuse pour l'humain souffrant d'arthrose (Hannan et al., 2000).

Dans le domaine vétérinaire, des modèles expérimentaux d'arthrose spontanée animale sont aussi retrouvés, notamment chez le cheval, pour étudier l'efficacité des thérapies utilisant les cellules-souches (Joswig et al., 2017), mais aussi pour le chat (Guillot et al., 2014; Klinck et al., 2015; Monteiro et al., 2016) et le chien avec de l'arthrose naturelle associée à la sensibilisation centrale (Gordon et al., 2003). L'arthrose naturelle du chat ressemble beaucoup à celle de l'humain (Ryan et al., 2013). Des similitudes (biomécanique, histologique, macroscopique, moléculaire et génomique) sont rapportées entre la pathologie humaine et le modèle d'arthrose du chien (Little et al., 2013). Des traitements qui se sont avérés efficaces pour l'arthrose du chat et du chien, ont montré également des effets positifs pour l'arthrose humaine (Klinck et al., 2017). Au niveau murin, les souris transgéniques STR/ort développent de l'arthrose naturelle (Kyostio-Moore et al., 2011) et ce modèle a permis de montrer une corrélation entre l'arthrose et la défectuosité du métabolisme des chondrocytes ou l'altération du taux d'apoptose (Jaeger et al., 2008). Un inconvénient de l'utilisation des modèles d'arthrose spontanée est l'incidence plus faible de la condition et la progression des lésions sur une période plus variable comparativement aux modèles induits. En conséquence, un plus grand nombre d'animaux doit être utilisé afin d'assurer une puissance statistique adéquate. Ceci, additionné à la progression variable des lésions et au moment non défini du début de la maladie, augmente considérablement les coûts liés aux études (Innes et al., 2010).

L'arthrose peut aussi être chimiquement induite par l'injection IA de molécules, comme le monosodium iodoacétate (MIA) (Guzman et al., 2003) ou le poly-éthylène-amine (Sakano et al., 2000) ou bien par des enzymes comme la papaïne (Grevenstein et al., 1991), la collagénase (Yeh et al., 2008), la trypsine ou la hyaluronidase (Pritzker 1994) et des cytokines (IL-1) (Scott et al., 2009). Une ovariectomie chez des rattes (Hoegh-Andersen et al., 2004) pourrait être aussi utilisée pour étudier les stades initiaux d'arthrose puisqu'une déficience en estrogène chez des femmes ménopausées semble participer au développement de l'arthrose (Christgau et al., 2004). La collagénase est également utilisée pour étudier le phénomène de la sensibilisation centrale par injection intra-thalamique (Castel et al., 2013).

Les modèles d'inductions chirurgicales d'arthrose prennent en moyenne 4 à 8 semaines pour développer un phénotype de douleur et ainsi, imiter la progression post-traumatique de la pathologie humaine plus étroitement (Ruan et al., 2013). En revanche, l'injection d'agents qui dégradent de manière sélective des composantes de la matrice extracellulaire du cartilage comme le MIA cause une douleur similaire à l'arthrose en moins d'une semaine, mais ne suivent pas la progression temporelle de la pathologie clinique (Marker et al., 2012). Cette apparition de la douleur inflammatoire neurogène rapide permet un criblage plus efficace des cibles thérapeutiques analgésiques potentielles, ce qui est une raison principale de la popularité de ces agents chimiques.

#### **1.4.2.2 Modèles expérimentaux de douleur neuropathique**

Chez les rongeurs, l'approche expérimentale la plus commune pour induire une neuropathie périphérique est la lésion nerveuse traumatique (complète ou partielle) par ligature, transection ou compression des nerfs sciatiques (Bennett et al., 1988; Wall et al., 1979), des branches distales du nerf sciatique (Decosterd et al., 2000), du nerf infraorbitaire (Imamura et al., 1997) ou des ganglions du nerf trijumeau (Ahn et al., 2009). Ces modèles de lésions neuronales reflètent la douleur neuropathique qui peut survenir suite à un traumatisme nerveux physique chez l'humain. Les neuropathies induites métaboliquement ou chimiquement chez les rongeurs sont aussi utilisées afin de mimer la douleur neuropathique périphérique liée au diabète neuropathique (Obrosova 2009) ou à la neurotoxicité associée à des chimiothérapies (Authier et al., 2009), aux traitements du virus de l'immunodéficience humaine (Wallace et al., 2007), à la névralgie post-herpétique (Fleetwood-Walker et al., 1999), à la douleur dans la pathologie de la

scélrose en plaque (Lynch et al., 2008) ou bien cancéreuse reliée à un ostéosarcome (Otis et al., 2011). Ainsi, plusieurs modèles de douleur neuropathique produisant de l'hyperalgésie et de l'allodynie thermique et mécanique sont disponibles afin d'étudier les conditions humaines associées à ces pathologies, chacune avec des forces et des limites afin d'aborder une large gamme de questions expérimentales, et les stratégies thérapeutiques reposent majoritairement sur la véracité de ces modèles animaux puisque les pathologies humaines de la douleur neuropathique sont très hétérogènes.

#### **1.4.2.3 Modèles expérimentaux de douleur viscérale et autres troubles dysfonctionnels**

La douleur reliée à une migraine est l'une des plus difficiles à modéliser puisque son apparition et sa progression reposent sur plusieurs facteurs et causes différentes (Eikermann-Haerter et al., 2008). Les modèles animaux de migraine utilisent généralement une vasodilatation par inhalation d'agents pharmacologiques ou une stimulation électrique directe des zones innervées par les nerfs du trijumeau (De Vries et al., 1999; Eikermann-Haerter et al., 2008). Les douleurs chroniques dorsales sont également difficiles à reproduire avec des modèles animaux. Le MIA a été utilisé récemment pour reproduire ce type de douleur par induction d'arthrose articulaire dans les facettes lombaires (Kim et al., 2015). Par contre, les modèles de douleurs viscérales sont utilisés depuis plus de trois décennies comme la distension colrectale afin d'étudier l'hypersensibilité viscérale (Ness et al., 1988). Les concepts généraux de ce modèle de distension ont ensuite été appliqués pour une vaste gamme de douleur viscérale, autant chez l'animal que l'humain facilitant la réussite prédictive des résultats, comprenant l'intestin, le système biliaire, les voies urinaires et les organes reproducteurs, (Ness 1999). La douleur post-chirurgicale aiguë est étudiée aussi avec des modèles, entre autres, suite à une incision à la surface plantaire ou à la queue, permettant ainsi une meilleure prise en charge de cette douleur post-chirurgicale (Kammerman et al., 2007).

#### **1.4.3 Facteurs affectant la translation inter-espèce**

L'un des problèmes majeurs présentement avec les modèles animaux c'est que plusieurs croient que les médicaments qui fonctionnent chez les animaux fonctionnent vraiment aussi chez les humains, mais ce n'est pas le cas. L'augmentation de la réponse positive dans le temps suite à un traitement placebo dans les études cliniques (Tuttle et al., 2015) et des lacunes

dans la validité des modèles animaux (et leur mise en œuvre) utilisés dans les études précliniques sont les deux sources principales pointées du doigt en ce moment dans la faible translation des résultats obtenus chez les animaux jusqu'aux essais cliniques chez l'humain (van der Worp et al., 2010). Dans les modèles animaux de la douleur, le problème se situe dans trois sphères (Craig 2009) : la nature du modèle ; les mesures de la douleur ; l'analyse des données. Chez l'humain, la douleur chronique est présente majoritairement chez la femme, d'âge moyen/âgée avec des antécédents génétiques hétérogènes alors que dans les modèles animaux, l'utilisation de rats est de sexes mâles et d'âges jeunes/adultes. Des différences quantitatives et qualitatives robustes dans le processus nociceptif ont déjà été amplement démontrées entre les différentes souches de souris, comme par exemple au niveau de l'expression différente des fibres sensorielles du CGRP et de la sensibilité thermique (Mogil et al., 2005), et selon le sexe (Sorge et al., 2011). D'où l'importance d'inclure des femelles dans les modèles animaux de la douleur.

Tout phénomène biologique comme la douleur peut être affecté par le stress et modifier le comportement des animaux. Le rôle des facteurs environnementaux dans le laboratoire de recherche a un rôle important à jouer dans la reproductibilité des données. Afin de diminuer le stress de l'animal et augmenter son bien-être général, il est important de prendre en considération ces paramètres. Une analgésie (Butler et al., 2009) ou une hyperalgésie peuvent être induites par le stress (Imbe et al., 2006) et les facteurs pouvant participer aux stress de l'animal sont, entre autres, l'hébergement (l'enrichissement de la cage, en groupe ou seul, présence d'autres espèces dans la salle, etc.), la diète (restriction), les agressions physiques, les conditions ambiantes, la période de l'année pendant laquelle les expérimentations ont lieu, les traitements pharmacologiques, etc. (Mogil 2017). Le genre du manipulateur a également été reconnu comme étant un facteur pouvant affecter le degré de nociception d'un animal. En effet, la simple présence d'un expérimentateur masculin (mais pas féminin) dans la salle d'essai peut provoquer du stress chez les souris et les rats, produisant une analgésie médiée par l'olfaction de molécules hormonales et affecte de manière robuste la sensibilité à la douleur, même au niveau des valeurs normales de base (Sorge et al., 2014). Tous ces facteurs ne sont pas standardisés et varient beaucoup entre les différents laboratoires, affectant donc la répétabilité et la reproductibilité des données obtenues dans un modèle animal de douleur.

## **1.4.4 Modalités d'évaluation de la douleur**

### **1.4.4.1 La validité et la fiabilité d'une mesure**

De la théorie de la spécificité de Descartes en 1644 est née la distinction somatosensorielle entre le toucher, le chaud, le froid et la douleur par von Frey en 1897 et le principe des fibres nociceptives A $\delta$  et C (Besson et al., 1987). Ensuite s'est ajoutée à cette vision ascendante la notion de sommation temporelle et spatiale et de modulation des afférences sensibles au niveau médullaire qui débouchera sur la théorie du portillon (Melzack et al., 1965). Il s'agit d'une des premières illustrations de l'existence de mécanismes endogènes de modulation de la douleur. Cette modulation peut être excitatrice ou inhibitrice. Ainsi, il est possible que le dérèglement de ces mécanismes endogènes de modulation de la douleur soit la source de certaines douleurs chroniques. Les douleurs persistantes n'ont donc plus pour seule origine une augmentation des afférences nociceptives, elles peuvent aussi résulter d'une baisse de l'inhibition ou d'une augmentation de l'excitation centrale. Ces mécanismes endogènes sont très nombreux et font intervenir de nombreux neurotransmetteurs. Le défi est donc de mesurer ces modifications au niveau de la réponse neurosensorielle et indirectement, de déterminer le degré de sensibilisation périphérique et/ou centrale. La sensibilisation se caractérise par une réponse neurosensorielle excessive en présence d'un stimulus nociceptif (hyperalgésie), une réponse neurosensorielle en absence de stimulus nociceptif (allodynie) et des perceptions sensorielles déplaisantes anormales (hypoesthésie / dysesthésie).

La crédibilité d'une méthode ou d'un instrument de mesure repose sur la fiabilité des mesures lors de la répétition du test et sa validité dans l'interprétation et l'utilisation de la mesure (Cohen et al., 2008). La fiabilité et la validité sont deux notions différentes dans le processus de validation d'une mesure. La sensibilité à détecter des différences minimales entre des individus recevant des traitements pharmacologiques différents par exemple, et la spécificité à bien mesurer le phénomène dont il est question, sont des composantes qui font partie intégrante de la validité de la mesure (Cohen et al., 2008). Toutes les mesures peuvent contenir une certaine marge d'erreur. La validité et la fiabilité portent sur la quantité et le type d'erreurs qui se produisent généralement et elles démontrent également de quelle façon évaluer la marge d'erreur dans une mesure. Et il existe deux types d'erreurs : (i) Les erreurs aléatoires qui ne sont pas attribuables à une cause précise. C'est une composante de l'erreur de mesure qui, dans des

mesures répétées, varie de façon imprévisible (imprécision autour de la réalité) ; (ii) Les erreurs systématiques tendent à pencher dans une direction en particulier et sont vraisemblablement attribuables à une cause spécifique. Ainsi, parce qu'elles sont orientées dans une direction, elles introduisent un biais (d'échantillonnage, d'observation ou de mesure, de confusion) dans une mesure. C'est une composante de l'erreur de mesure qui, dans des mesures répétées, demeure constante ou varie de façon prévisible induisant une déformation de la réalité. On considère que les erreurs aléatoires font partie de la fiabilité d'une mesure et que les erreurs systématiques font partie de la validité d'une mesure.

Les trois principales façons d'estimer la validité en métrologie sont : la validité de contenu qui réfère à la représentation adéquate de l'échantillon d'items utilisés pour mesurer un comportement ou une caractéristique ; la validité de critères représente le degré d'association entre un instrument de mesure ou une technique et un autre instrument indépendant susceptible de mesurer le même phénomène ou concept ; la validité de construit tente de valider le corps théorique sous-jacent à la mesure et de vérifier des hypothèses d'associations. Les deux principales approches pour évaluer la validité de construit sont la validité de convergence et la validité de différenciation. Lorsque plusieurs considérations sont étudiées, plus forte sera la validité obtenue (Gelinas et al., 2008; Goodwin 2002).

Les coefficients de fiabilité sont d'importants indicateurs de la qualité d'un instrument de mesure ou d'une méthode permettant de déterminer les sources (les manipulateurs, les instruments et l'environnement) à l'origine de la variabilité. Pour ce faire, il existe plusieurs types de fiabilité avec des stratégies de calculs pour les différents coefficients de détermination. On note (Gelinas et al., 2008; Goodwin 2002) :

- La fiabilité inter-observateur qui évalue la variabilité entre 2 manipulateurs à l'aide d'un coefficient de corrélation (Pearson ou Spearman), un coefficient de corrélation intra-classe (ICC) qui évalue l'homogénéité des observations ou un coefficient de Kappa Cohen pour une mesure qualitative.
- La fiabilité intra-observateur qui évalue la variabilité d'une série de mesures effectuées à des périodes différentes par le même manipulateur à l'aide d'un coefficient de corrélation (Pearson ou Spearman) ou un ICC.
- Le test-retest (stabilité) évalue la constance dans le temps (périodes différentes) des résultats obtenus d'une mesure répétée à l'aide d'un coefficient de corrélation. Le test-retest est

celui le plus utilisé dans le développement des méthodes de mesures et un coefficient élevé signifie que les mesures ont peu changé entre le passage du test et du retest.

Un coefficient de corrélation de zéro fait état d'une absence de fidélité et un coefficient d'un est le miroir d'une fidélité parfaite. Dans le cadre d'une étude de validation, les valeurs de coefficient sont empiriquement établies et on considère qu'un coefficient de 0,70 est acceptable en recherche scientifique, mais le choix d'une mesure ayant la meilleure fiabilité est déterminant pour étudier la validité des mesures. La validité est également étudiée par comparaison de groupes ayant des conditions pathologiques (naïf en comparaison avec chirurgie par exemple) différentes ou recevant des traitements pharmacologiques nociceptifs différents (non-traité/placebo/traité). L'interprétabilité, l'acceptabilité et la faisabilité sont d'autres propriétés également à considérer dans le processus de validation d'une méthode de mesure de la douleur.

## **1.4.5 Méthodes de mesures de la douleur**

### **1.4.5.1 Techniques basées sur la physiologie**

Il est bien connu que la douleur modifie les signes vitaux cliniques chez un individu de par le SNA. L'augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle et de la fréquence respiratoire sont les principaux signes. Il est possible aussi de noter de l'agitation, des grimaces faciales ou de la rigidité. La variabilité du rythme cardiaque (Kovacs et al., 2014) et de la pression sanguine ou la dilatation pupillaire (Ellermeier et al., 1995) sont des méthodes faciles pour générer des données objectives pour mesurer la douleur. Le principal inconvénient de ces techniques c'est qu'elles ne sont pas spécifiques à la stimulation nociceptive, mais peuvent être associées comme par exemple, au stress ou à l'anxiété (manipulation des animaux) et des précautions doivent être prises dans l'interprétation des résultats obtenus. La réponse au stress libère une variété d'hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les dosages hormonaux des glucocorticoïdes (cortisol, cortisone) ou des catécholamines (noradrénaline) peuvent être utilisés dans les études de la perception de la douleur (Mellor et al., 1989). Les dosages hormonaux sont pratiques puisque ce sont des molécules stables apparaissant dans des concentrations mesurables et des fluides biologiques facilement accessibles (plasma, urine, salive, etc.). Il devient donc primordial de diminuer le stress au minimum (acclimatation, hébergement, nutrition, etc.) dans ces études afin de minimiser les impacts sur ces indicateurs



de douleur. Afin d'augmenter la fiabilité et la validité de ces indicateurs, la combinaison avec d'autres méthodes pourrait les rendre plus utiles.

#### **1.4.5.2 Les échelles et les grilles pour évaluer les comportements nociceptifs**

Les instruments utilisés en médecine vétérinaire pour évaluer la douleur chez les animaux suivent une approche par notation de score sur différents types d'échelles. Les échelles unidimensionnelles incluent les échelles descriptives ou numériques simples (Holton et al., 1998) et l'échelle visuelle analogue (Welsh et al., 1993). Ces échelles mesurent une seule dimension qui est majoritairement l'intensité de douleur post-opératoire ou reliée à la boiterie. Malgré la simplicité de ces échelles, l'obtention de résultats peu fiables supporte une faible validité remettant en question leur utilisation afin d'évaluer la douleur (Holton et al., 1998). Les échelles multidimensionnelles et composites sont quant à elles, plus complexes puisqu'elles mesurent différentes dimensions de la douleur comme proposée dans l'essence même de sa définition (changements physiologiques et comportementaux) (Melzack et al., 1965). Parmi celles-ci, on note des échelles de douleur aiguë post-opératoire (Glasgow Composite Measure Pain Scale (Holton et al., 2001) ou l'échelle composite de l'Association vétérinaire pour l'anesthésie et l'analgésie animales (Riolland et al., 2012) et des échelles associées à des douleurs chroniques comme dans la pathologie de l'arthrose chez le chien (Hielm-Bjorkman et al., 2009) ou le chat (Klinck et al., 2015) ou orthopédique du cheval (Bussières et al., 2008). En plus de mesurer l'intensité de la douleur, ces échelles évaluent aussi les fonctions physiques, les troubles émotionnels et les effets des traitements. Les échelles multidimensionnelles sont beaucoup plus fiables et valides puisqu'elles permettent de différencier des groupes d'animaux dans des conditions opposées (sains *versus* pathologiques ou traités *versus* non traités) (Morton et al., 2005; Walton et al., 2013).

Chez les rongeurs, des échelles de grimaces de la souris (Langford et al., 2010) et du rat (Sotocinal et al., 2011) ont été développées basées sur la modification des mimiques faciales chez le nourrisson associée à l'expression de la douleur. La validation et la fiabilité de ces échelles ont montré leur efficacité à évaluer la douleur aiguë chez la souris (Leach et al., 2012) et le rat (Sotocinal et al., 2011) par des modifications dans l'expression faciale de ces rongeurs. La détection de l'effet d'un traitement analgésique efficace a aussi été observée dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat (Philips et al., 2017). Cependant, l'échelle de grimaces de



la souris a montré des différences dans les valeurs de bases selon le sexe et la souche de la souris saine (Miller et al., 2015), limitant la translation clinique de cet outil. Par contre, les échelles de grimaces offrent un potentiel intéressant dans le suivi du bien-être général des animaux de laboratoire (Miller et al., 2015).

Malgré que les différents types d'échelles soient des outils rapides, non invasifs et généralement de conception simple pour mesurer subjectivement la douleur, il en reste que la génèse de données catégoriques non-paramétriques est très variable entre les différents observateurs, restreignant son utilisation due à la faible reproductibilité inter- et intra-laboratoire.

#### **1.4.5.3 Les mesures réflexes**

Les techniques s'appuyant sur les mesures des seuils réflexes (ou mesures des seuils de retrait) d'un membre suite à un stimulus croissant engendrée par une stimulation thermique, mécanique ou électrique, font parties des tests sensoriels quantitatifs (Mogil 2009). Ces tests tentent de détecter l'apparition ou la variation de l'intensité (quantification) de l'hypersensibilité (hyperalgésie et allodynie), la facilitation de la sommation temporelle ou une diminution des CIDNs suite au processus douloureux (Le Bars et al., 1979b, 1979c) qui sont des composantes fondamentales de la chronicisation de la douleur et par le fait même, de la sensibilisation centrale. Les réponses aux stimuli dans les tests sensoriels quantitatifs comportent des composantes réflexes et cognitives. Les composantes réflexes sont traitées par la moelle épinière au niveau du dermatome du stimulus (réflexes segmentaires) et également en association avec d'autres dermatomes (réflexes longs). Elles impliquent le retrait du membre stimulé et/ou la contraction des muscles de cette zone. Ils sont majoritairement limités aux dermatomes stimulés, mais parfois, ils impliquent aussi les réflexes longs avec des réponses dans d'autres segments du corps. Les composantes cognitives et émotionnelles d'une réponse sont celles qui font intervenir les centres supérieurs du SNC et sont indiqués par des comportements plus complexes comme la perception cognitive et l'aversion au stimulus. Ces réponses sont généralement plus globales que les réponses au réflexe localisées et lors des tests de seuil, il est important d'être certain que la réponse mesurée est cognitive plutôt que de nature simplement réflexe (Johnson 2016).

#### 1.4.5.3.1 Les mesures réflexes mécaniques

##### 1.4.5.3.1.1 Le Randall-Selitto

La technique de Randall-Selitto (Randall et al., 1957) a été originalement développée pour mesurer le seuil de réponse dans la douleur inflammatoire suite à une pression mécanique exercée sur la surface plantaire (ou dorsale) de la patte (Santos-Nogueira et al., 2012) ou de la queue (Elhabazi et al., 2014) par un embout pointu métallique. Elle permet principalement de mesurer l'hyperalgésie secondaire puisque la force du stimulus exercé est très grande, mais l'utilisation d'un embout rond moins piquant pourrait permettre aussi de détecter l'allodynie. Chez les rongeurs, son utilisation est peu populaire puisque la technique demande une immobilisation (contention) des animaux, induisant un degré élevé de stress et rendant l'interprétation des résultats difficiles. Dans un modèle d'arthrose chez le rat (Bove et al., 2006), le Randall-Selitto n'a pas réussi à montrer des différences dans les seuils de retrait pour des groupes opposés (Sham *versus* chirurgie arthroscopique) suggérant des qualités (fiabilité et validité) métrologiques faibles dans l'évaluation de l'hyperalgésie mécanique secondaire.

##### 1.4.5.3.1.2 Le von Frey

La technique mécanique qui vise à évaluer la sensibilité tactile concerne l'application perpendiculaire de filaments rigides sous la surface plantaire de la patte, communément appelée von Frey pour faire référence à celui qui a initialement établi la théorie. Les filaments de nylon sont couramment utilisés pour l'évaluation de l'allodynie tactile et puisque le stimulus non nociceptif est appliqué généralement à un site distant de la lésion, on quantifie l'allodynie dite secondaire (sensibilisation centrale). La première élaboration de cette méthode, dite manuelle, consiste à appliquer de façon croissante des filaments de nylon calibrés (de différentes tailles) jusqu'à la réaction attendue du retrait de la patte, ce qui correspond à la stimulation nociceptive nécessaire pour que l'animal tente d'échapper au stimulus nociceptif (seuil de retrait) (Chaplan et al., 1994). Afin de remédier à la stimulation répétée, de diminuer le temps d'expérimentation et de permettre une meilleure standardisation (selon l'espèce animale, élaboration d'une fenêtre de valeur normale), la version électronique du von Frey a été développée (Cunha et al., 2004; Vivancos et al., 2004). Cette dernière version comporte seulement un filament de polypropylène, variant selon la rigidité de celle-ci dépendamment du type de sensation

douloureuse voulant être mesuré (hyperalgésie et/ou allodynie). La force (newton) appliquée par la sonde (sans être pliée) est convertie en un signal digital en gramme et une valeur numérique unique est affichée (le maximum atteint) puis notée au moment du retrait du membre. Le von Frey électronique s'est avéré beaucoup plus sensible, fiable, rapide et efficace pour mesurer les effets analgésiques d'une molécule pharmacologique dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat que la méthode classique (Vivancos et al., 2004).

#### 1.4.5.3.1.3 Le test d'agrippement

Ce test mesure la performance neuromusculaire des rongeurs à l'aide de leur capacité à s'agripper afin de mettre en évidence l'hypersensibilité pouvant affecter les muscles. Le principe de ce test est de mesurer la force maximale et le temps de retenue qu'un animal peut maintenir en s'agrippant sur une barre de tension spécialement conçue à cet effet. Le test se base sur le fait que le phénomène d'allodynie va engendrer une diminution de la force et du temps d'agrippement d'un animal atteint (Kehl et al., 2000).

#### 1.4.5.3.1.4 L'algomètre de pression

L'algomètre de pression mesure le seuil de pression douloureux de la sensibilité relative d'un muscle ou d'une articulation par une mesure réflexe mécanique (Fischer 1987). Cette méthode a été l'une des premières à être fiable et valide afin de mesurer l'intensité de la douleur chez l'humain (Fischer 1987; Reeves et al., 1986). L'algomètre se présente sous la forme d'un cadran cylindrique avec une tige calibrée en son milieu afin de mesurer la force appliquée à la tige lors de la poussée sur son extrémité. Par convention, la tige de l'algomètre est placée à la perpendiculaire des tissus et la pression est appliquée avec une vitesse lente afin que la tension soit constante et ce, jusqu'au manifestement d'un inconfort (seuil de retrait) de l'individu (Lane et al., 2016). Dans une étude de validation de différents tests sensoriels quantitatifs, l'utilisation de l'algomètre de pression a permis de distinguer des chiens arthrosiques ou de chiens sains. Les seuils de pression étaient moins élevés pour les chiens souffrant de douleur chronique liée à l'arthrose (Knazovicky et al., 2016).

#### 1.4.5.3.2 Les mesures réflexes thermiques

Les tests thermiques sont axés sur la détection de la variation du temps requis pour l'apparition d'un comportement d'évitement. Plusieurs variantes de ce test sont disponibles par

des stimulations thermiques des pattes ou de la queue de l'animal. La première a été décrite chez le rat (test de Hargreaves) par l'application ciblée d'un stimulus thermique nociceptif à la surface plantaire à travers le verre jusqu'à ce que l'animal montre des signes brusques d'inconfort (soulève la patte, léchage ou tremblements) à différentes températures pour échapper à la chaleur, ce qui indique le temps de retrait de la patte (temps de latence, en secondes) (Hargreaves et al., 1988). La seconde variante ne cible pas une patte en particulier puisque l'animal est déposé directement sur une plaque chauffante (Eddy et al., 1953). Quant au test de la queue, celle-ci consiste en stimuler thermiquement par une chaleur radiante ou bien plonger dans un bassin d'eau à une température fixe ou prédéterminée et le temps de retrait de la queue est calculé et comparé (Mogil et al., 1999). Bien que facilement mesurable chez les animaux et les humains par des tests simples, les réflexes de retrait dépendent entièrement de la bonne intégrité du SN de transmission de la douleur. Comme leur nom l'indique, ils ne sont que des réflexes et ne tiennent aucunement compte d'un aspect important dans l'évaluation de la douleur clinique, à savoir : l'intervention des composants cognitifs et émotionnels d'un apprentissage et de processus supraspinaux (Mogil 2009).

#### **1.4.5.4 Le test de la sommation temporelle**

L'hypersensibilité peut aussi être mesurée par un test sensoriel quantitatif basé sur la sommation temporelle dépendant des récepteurs NMDA de la douleur par des stimulations mécaniques répétées en tenant compte des composantes cognitivo-affectives de la douleur. La facilitation de la sommation temporelle se développe lors de douleur chronique comme l'arthrose (Mease et al., 2011), supportant son implication dans la sensibilisation centrale (Latremoliere et al., 2009). Le principe est basé sur la sommation de stimulations mécaniques répétées induisant une réponse douloureuse progressive de plus en plus intense correspondant à une décharge prolongée des fibres C par une augmentation en intensité et durée de la douleur secondaire. Le stimulus mécanique répété est induit par une pince métallique incluse à l'intérieur d'un dispositif conique et mise en place autour du membre d'intérêt de l'animal par un brassard. L'intensité (variant de 2 à 6 newtons) induite par la pression de l'air et le nombre de stimulations sont prédéterminés par l'appareil et le manipulateur (Dixon et al., 2010). Les stimulations répétées sont arrêtées et leur nombre noté au moment où l'animal montre un comportement signifiant un inconfort relié à ces stimulations. Il a été démontré que la sommation temporelle

de la douleur par des stimulations mécaniques répétées chez le chat arthrosique est facilitée en comparaison avec des chats sains (Guillot et al., 2014) et corrélée positivement avec les seuils de retrait von Frey, justifiant la validité et la fiabilité de cette nouvelle méthode pour mesurer la douleur et offrant ainsi une opportunité d'utiliser ce biomarqueur dans la recherche translationnelle des douleurs articulaires. Ainsi, chez des patients souffrant d'arthrose de la hanche, parmi les différents tests quantitatifs sensoriels utilisés, le test par la sommation temporelle de la douleur a montré la plus grande sensibilité afin de détecter la sensibilisation centrale avant une chirurgie reconstructive. Le degré de soulagement analgésique post-opératoire étant liée au niveau de sommation temporelle de la douleur avant l'intervention chirurgicale, c'est-à-dire, plus élevée la sommation temporelle de la douleur est présente avant l'opération, plus difficile sera la tâche de soulager le patient après la chirurgie (Izumi et al., 2017). Chez l'humain, la stimulation répétée peut aussi être de type thermique, c'est à dire que la température augmente rapidement d'un certain niveau prédéterminé (10 degré) pour ensuite retourner au seuil initial et ce, pour plusieurs séquences successives (10 répétitions). Le patient évalue ensuite sa douleur sur une échelle visuelle analogue après chaque séquence (Reynolds et al., 2017). L'index de sommation temporelle ainsi dérivé de cette évaluation peut servir comme un marqueur quantitatif du degré de sensibilisation centrale (Reynolds et al., 2017). La sommation temporelle thermique a permis de catégoriser des sous-groupes de sujets selon leur capacité à faciliter ou atténuer la douleur (Penza et al., 2017). Chez des patients atteints de douleur chronique (fibromyalgie), la sommation temporelle thermique s'est avérée un outil valide afin de quantifier la sensibilisation centrale dans un contexte de pratique clinique (Staud et al., 2014). Contrairement à la sommation temporelle mécanique dont les seuils somatosensoriels sont augmentés chez l'humain plus âgé, la stimulation répétée thermique n'est pas influencée par l'âge de l'individu (Lautenbacher et al., 2005).

#### **1.4.5.5 Le test de la modulation de la douleur conditionnée**

La modulation de la douleur conditionnée (MDC) est le terme utilisé pour décrire le paradigme psychophysique dans lequel un stimulus distant douloureux conditionné est utilisé pour induire un comportement détectable chez l'humain corrélé à l'activation des CIDNs. Ce principe vient du fait que l'application d'une douleur soudaine à une partie du corps va inhiber également la douleur dans plusieurs autres régions (Le Bars et al., 1979b, 1979c). L'activation

des CIDNs est une forme unique d'analgésie endogène induite par le recrutement d'interneurones enképhalinerigiques et gabaergiques (Kraus et al., 1981). Il a été possible de mesurer une diminution de la MDC par la comparaison du nombre de potentiels d'actions enregistrés suite à des stimulations par des filaments de von Frey avant et après l'installation d'une pince au niveau de l'oreille chez le rat par exemple, dans un modèle de douleur neuropathique (Bannister et al., 2015). Chez des patients souffrant de douleur neuropathique et chronique (Yarnitsky 2010; Yarnitsky et al., 2012), la MDC est diminuée, supportant une altération dans les mécanismes de modulations descendantes de la douleur. Cette diminution de MDC peut être renversée après une chirurgie chez des patients souffrants d'arthrose (Graven-Nielsen et al., 2012). Cette technique a également permis de valider l'implication des systèmes adrénérigiques et sérotoninérigiques dans les CIDNs par l'utilisation de différents agents pharmacologiques activant ou inhibant ces systèmes (Bannister et al., 2017; Bannister et al., 2015; Yarnitsky et al., 2012), suggérant que la modulation descendante de la douleur peut être une cible prometteuse pour des interventions pharmacologiques. L'intérêt pour l'utilisation du test par la MDC est grandissant en science expérimentale comme biomarqueur de la douleur chronique, mais la standardisation de cette méthode est incomplète malgré une bonne fiabilité de cette mesure (Kennedy et al., 2016). Une très grande variabilité inter-individuelle dans l'ordre de grandeur de la MDC est présente chez l'humain dépendant du sexe, de l'âge et d'autres facteurs (Edwards et al., 2003; Ge et al., 2004) limitant la translation inter-espèce de cette technique.

#### **1.4.5.6 Les mesures innées/spontanées**

En plus des arcs réflexes, il est possible aussi de quantifier la douleur par des mesures innées ou spontanées telles que les mesures de distribution pondérale statique, dynamique et l'analyse de la démarche cinétique. Des douleurs chroniques aux articulations chez un animal vont modifier leurs capacités motrices et par le fait même, une multitude de paramètres (mesures cinétiques et cinématiques) reliés à sa démarche est modulée, comme par exemple, la distribution de sa charge pondérale, la force maximale verticale d'appui et la vitesse.

#### *1.4.5.6.1 Distribution pondérale statique*

Lors de douleur articulaire, des changements dans la démarche des individus sont observés comme entre autres, une redistribution du poids afin de contrer la douleur associée à une charge pondérale sur un membre (Messier 1994). Durant le test de distribution pondérale statique, l'animal est placé dans un support qui le maintient légèrement incliné verticalement pendant que ses pattes arrières reposent sur deux capteurs à plaque séparés. La redistribution du poids est notée et cette mesure peut servir à quantifier le niveau de douleur par le calcul de la différence entre les pattes arrière (asymétrie de distribution) ou selon le poids corporel total. Il est possible de différencier des animaux souffrant de douleur chronique reliée à l'arthrose en comparaison avec des animaux sains (Bove et al., 2003). Dans un modèle rongeur de douleur neuropathique, l'utilisation de cette technique s'est avérée reproductible et efficace pour détecter des effets analgésiques d'un traitement aux AINSs et aux opioïdes, associant le déficit pondéral à une douleur spontanée et non pas à une conséquence de l'allodynie mécanique (Nakazato-Imasato et al., 2009). La validité et la fiabilité de cet outil sont également reconnues en médecine vétérinaire chez des chiens (Hyytiainen et al., 2012; Kapatkin et al., 2016) souffrants d'arthrose pour mesurer le niveau d'atteinte et de douleur. Cette technique a néanmoins le désavantage ne pas avoir les données pour les pattes avant, limitant la compréhension de la redistribution de la charge pondérale.

#### *1.4.5.6.2 Distribution pondérale dynamique*

Cette variante du test de la distribution pondérale est basée sur le même principe que la méthode statique sauf qu'ici l'animal est évalué librement selon ses quatre pattes (distribution du poids, surface et durée de contact pour chacune des pattes). L'animal est placé dans une boîte en plexiglas muni d'un tapis avec des capteurs de pression en même temps qu'une caméra vidéo capture les déplacements du rat puis le tout est synchronisé et relié à un système information notant les données dynamiques. Cette méthode a l'avantage d'être plus précise dans la cueillette des données par l'élimination du biais du manipulateur, la vidéo élimine les mouvements reliés au toilettage, de diminuer l'analgésie induite par le stress puisque l'animal est libre de mouvements et d'obtenir des données de distribution pondérale pour tous les membres et être en mesure de mieux comprendre les mécanismes de redistribution de la charge pondérale. Une modification de la distribution pondérale dynamique a été notée dans des modèles de douleurs

inflammatoires, neuropathiques et cancéreuses chez le rat (Tetreault et al., 2011). En revanche, cette technique n'a pas réussi à montrer un effet traitement chez des souris dans un modèle de douleur chronique inflammatoire (Bert et al., 2016), contrairement à un modèle de douleur viscérale (Laux-Biehlmann et al., 2016), suggérant des lacunes (résultats inconsistants) dans la validation de cette méthode (aucune standardisation).

#### *1.4.5.6.3 Mesures cinétiques de la démarche*

L'analyse de la démarche est une méthode moderne afin de quantifier la douleur ressentie par un animal possédant d'excellentes qualités métrologiques. Ces mesures cinétiques permettent d'obtenir beaucoup plus de paramètres tels que la vitesse et l'accélération de l'animal, la surface et le temps de contact des pattes (empreintes), le pic de force verticale, l'amplitude de la flouée et plusieurs autres et ce, individuellement pour chaque patte. Une asymétrie se développe au niveau de la démarche afin de protéger un membre douloureux. Il a été établi que le temps de contact et le pic de force verticale d'un membre douloureux sont diminués comparativement au membre sain dans un modèle rongeur de douleur inflammatoire (Miyagi et al., 2011). L'analyse de la démarche cinématique est également très populaire en clinique dans des modèles canins et félins d'arthrose tout comme la mesure des changements dans les pics verticaux de force d'agents chondroprotecteurs ou analgésiques dans des modèles expérimentaux de la douleur animale (Moreau et al., 2014). Cette technique demande de faire marcher ou passer l'animal en respectant un temps précis dans un corridor muni de tapis capteurs de pression (plaque de force pour le chien (Moreau et al., 2004) ou un Kinetic weight bearing (Bioseb) pour le rongeur) ou d'une plaque de verre éclairée par une lumière fluorescente créant une image d'empreinte de pas lumineuse (le CatWalk™ pour des données spatiotemporelles (Hamers et al., 2001)) et équipé d'une caméra vidéo, le tout relié à un système informatique afin de générer et enregistrer les données relatives à la démarche. Chez les rongeurs (Hamers et al., 2001; Lakes et al., 2016), le CatWalk™ s'est avéré une méthode valide et fiable afin de quantifier la douleur et d'obtenir une série de mesures dynamiques et statiques de paramètres corrélés avec l'allodynie tactile détectée par le von Frey dans un modèle de douleur neuropathique (Vrinten et al., 2003). L'utilisation d'un tapis roulant est une méthode pouvant aussi permettre l'analyse de la démarche en imposant un rythme à l'animal (Berryman et al., 2009).



#### *1.4.5.6.4 Activité motrice spontanée*

Un animal dans un état douloureux va modifier (diminuer) sa capacité globale à bouger et conséquemment, modifier ses mouvements. L'évaluation de l'activité motrice et des comportements d'un animal peuvent être mesurés afin de quantifier la douleur chez des individus souffrant de douleurs chroniques. L'évaluation de l'activité motrice basée sur l'accéléromètre (télémétrie) est une méthode objective complémentaire qui est valide et fiable afin de détecter l'arthrose (diminution de l'activité motrice) ou de mesurer l'ampleur des effets pharmacologiques de molécules potentiellement prometteuses dans des modèles félins arthrosiques (Guillot et al., 2013; Lascelles et al., 2007) et canins (Moreau et al., 2012). Il s'agit d'une puce installée au cou de l'animal et préprogrammée afin de quantifier un compte de mouvements à l'aide d'un accéléromètre, venant du même principe qu'un podomètre, mais selon trois axes dans l'espace. La mesure de l'activité d'exploration spontanée est utilisée pour l'analyse de la douleur persistante par captation des activités de locomotion et de déplacement par des faisceaux lumineux en plaçant l'animal dans une cage de plastique (Martin et al., 2004). Il existe aussi des systèmes automatisés qui quantifient les comportements normaux pour ensuite quantifier suite à une douleur, les changements comportementaux possiblement induits par la douleur (Van de Weerd et al., 2001). La douleur induite par le mouvement en forçant l'animal à se maintenir sur une roue rotative, comme le Rotarod™ est un test permettant d'évaluer l'activité motrice. Le temps que l'animal passe sur l'appareil sans tomber (période de latence) ou la réussite de la session sont des indicateurs d'une mesure objective de la coordination motrice et de la douleur évoquée par le mouvement. Suite à une induction de l'arthrose dans un modèle rongeur, la performance sur la roue est diminuée et reliée au développement de douleur inflammatoire neurogène du genou (Ruan et al., 2013).

#### **1.4.5.7 Les tests opérant**

Le désir d'éviter la douleur est tout à fait indicateur de la réponse affective d'une lésion nociceptive (Neubert et al., 2005). Les tests opérants sont basés sur la composante de l'expérience aversive dont le but est de mesurer l'effet au niveau du SNC (régions cortico-limbiques). Le principe est de permettre à l'animal qui est libre de faire l'apprentissage de la douleur dans un environnement contrôlé, de choisir entre deux situations possibles et ainsi déterminer, la composante dissuasive d'un processus douloureux (LaBuda et al., 2000). Ces

tests nécessitent une période d'acclimatation essentielle pour la validité de la méthode afin que l'animal identifie clairement le procédé d'échappement et ainsi, en présence d'hypersensibilité, toute modification dans le comportement d'évitement volontaire va suggérer une différence de perception du stimulus nociceptif. Un effet analgésique d'une molécule sera potentiellement positif si l'animal cesse de chercher à fuir la stimulation aversive (Morgan et al., 2008).

Globalement, il est possible de classer les tests opérants selon l'évitement acquis (ou l'environnement aversif) et le conflit de renforcement (Mogil 2009). Dans le test de l'évitement d'acquis, l'animal a le choix entre subir une stimulation déplaisante ou y échapper, en choisissant volontairement un environnement normalement aversif. Il y a le test de la préférence thermique dans lequel l'animal a accès librement aux deux compartiments thermiques opposés (l'un avec un sol chaud et l'autre froid). En situation normale, le rat va préférer le compartiment plus chaud, mais en présence d'hyperalgésie ou d'allodynie, il se contentera de rester sur le sol froid (Morgan et al., 2008). Quant au test du paradigme du comportement d'échappement / d'évitement, le principe consiste à offrir à l'animal le choix entre demeurer dans son environnement favori (sombre), mais être soumis à un stimulus aversif (stimulation de la patte douloureuse avec un filament de von Frey) ou à se déplacer librement vers un environnement déplaisant (éclairé), mais où il n'est pas soumis à un stimulus aversif (stimulation de la patte non douloureuse avec un filament de von Frey). Dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat, ce test a été suffisamment sensible pour détecter des effets analgésiques et les résultats étaient corrélés avec une diminution d'allodynie tactile, supportant la validité de cet outil (Boyce-Rustay et al., 2010).

Dans le test de conflit de renforcement, la motivation à recevoir une récompense est utilisée comme un indice de confort. La récompense dans ce test est accompagnée d'un stimulus aversif (électrique ou thermique). Un phénomène d'hypersensibilité va influencer les habitudes d'un animal douloureux et l'action d'un analgésique peut ainsi être démontrée par le retour du comportement normal et ceci est objectivement quantifiable par le nombre de stimulations requises pour obtenir des récompenses (Mauderli et al., 2000).

## 1.5 La douleur chronique et l'arthrose

### 1.5.1 Généralités

L'arthrose est la plus commune des maladies dégénératives des articulations, affectant plus de 25 % de la population au-delà de 18 ans. Son étiologie est multifactorielle incluant soit une cause idiopathique dite arthrose de stade primaire ou des facteurs tels qu'une lésion articulaire (sportive ou accidentelle), l'obésité, l'âge ou l'hérédité pour faire référence à l'arthrose de stade secondaire (Chen et al., 2017). L'arthrose est un processus et une maladie complexes impliquant l'ensemble des composantes d'une articulation, notamment celle du genou, avec une apparition plus élevée avec l'âge, en particulier pour les femmes (Healey et al., 1985; Neogi 2013). L'arthrose se manifeste par des changements morphologiques, biomécaniques, moléculaires et biochimiques au niveau des cellules et de la matrice extracellulaire. C'est la principale cause d'invalidité par une perte de locomotion et/ou de qualité de vie et d'un stress émotionnel suite à la douleur chronique (Petersson et al., 2002), principal symptôme de la consultation médicale outre l'instabilité articulaire, la rigidité et une perte de l'espace articulaire lors d'une radiographie (Kuyinu et al., 2016; Man et al., 2015; Petersson et al., 2002).

### 1.5.2 L'articulation du genou sain

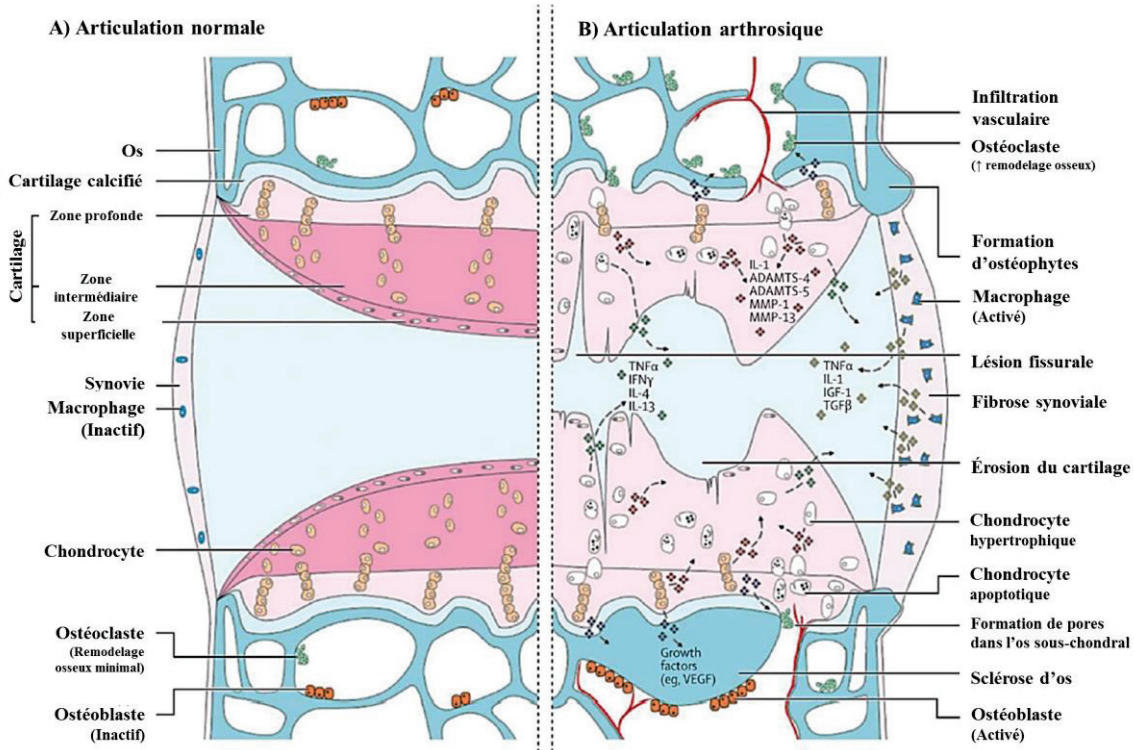
Il existe plusieurs types d'articulation différent selon leur anatomie et leur physiologie, mais celle du genou, dite composée (liée par plus de deux os et de type synovial) comporte deux parties, l'articulation fémoro-patellaire et -tibiale et fait référence à l'articulation du grasset chez l'animal vertébré. Le genou est une articulation mobile (diarthrose) avec un degré de liberté mono-axiale dans le plan sagittal et pouvant accomplir des mouvements de flexion et d'extension d'un membre, mais limitée due à la tension des ligaments collatéraux. Dans un genou sain, plusieurs composantes apportent un soutien à l'articulation (**Figure 11** panneau A) : le ménisque, le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et la membrane synoviale (Fox et al., 2012; Sophia Fox et al., 2009).

Le ménisque participe à plusieurs fonctions comprenant l'amortissement de la charge, l'absorption des chocs et le glissement fluide de l'articulation. Sa matrice extracellulaire est un

fibrocartilage composé principalement d'eau, de collagène de type I et de protéoglycanes (principalement des agrécanes). Ses autres composantes comprennent le collagène de type II, III, V et VI (Fox et al., 2012; Verdonk et al., 2005).

Le cartilage articulaire est un tissu hautement spécialisé permettant le glissement des surfaces osseuses et résiste aux forces de compression et d'élasticité. Il est divisé en plusieurs zones (superficielle, intermédiaire et profonde) différentes selon leur composition de matrice et leur orientation cellulaire (Sophia Fox et al., 2009). Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin composé d'un tissu hypocellulaire unique, alymphatique, sans innervation et vascularisation, composé de chondrocytes imprégnés dans une matrice extracellulaire de collagène de type II, de protéoglycanes et de protéines non collagéniques. Les chondrocytes ne se divisent pas dans des conditions physiologiques normales, mais permettent le remplacement permanent de la matrice extracellulaire (Sophia Fox et al., 2009). Ils ont la capacité de répondre à des stimulations mécaniques et biologiques (cytokines, facteurs de croissance et de différenciation) apportant des changements à la matrice cartilagineuse. Le renouvellement du cartilage articulaire se fait tout au long de la vie *via* des facteurs de croissances, comme les facteurs de croissance de transformation bêta (TGF $\beta$ ) ou semblable à l'insuline 1 (IGF-1), des fibroblastes, des tissus connectifs et des protéines (lectine, morphogénétiques de l'os ou dérivées du cartilage) (Finsson et al., 2012; Fortier et al., 2011; Martel-Pelletier et al., 2008). Le cartilage calcifié sert d'interface entre l'os et le cartilage articulaire.

L'os sous-chondral procure un soutien à l'articulation et est composé de collagène de type I minéralisé. La membrane synoviale (synovie) produit le liquide synovial, un fluide composé de lubricine et d'acide hyaluronique, servant de lubrifiant à l'articulation et nourrissant le cartilage articulaire (Jay et al., 2000). La synovie ou membrane synoviale est composée de deux types de synoviocytes : les fibroblastes et les macrophages (Scanzello et al., 2012). Les fibroblastes synoviaux produisent les composantes du liquide synovial. Les macrophages synoviaux sont habituellement inactifs, mais s'activent durant un processus inflammatoire (Kuyinu et al., 2016).



**Figure 11. Changements structuraux et voies de signalisation d'une articulation normale (A) et arthrosique (B).**

L'arthrose est une maladie mécano-inflammatoire impliquant l'os sous-chondral, le cartilage articulaire et la membrane synoviale. Elle est la résultante d'un déséquilibre entre des facteurs anaboliques et cataboliques dans l'homéostasie des chondrocytes impliquant plusieurs médiateurs (cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance, protéases). Désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine (ADAMTS), interleukine (IL), facteur de croissance de transformation bêta (TGF $\beta$ ), facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-1), métalloprotéinase (MMP), facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), interféron gamma (IFN $\gamma$ ), facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ). Figure tirée de (Glyn-Jones et al., 2015) et modifiée de (Kuyinu et al., 2016).

### 1.5.3 L'articulation du genou arthrosique

L'arthrose est le résultat d'une série de désordres mécaniques et biologiques complexes dans la fonction normale des différentes composantes de l'articulation résultant en un trouble articulaire structurel et fonctionnel. C'est une pathologie qui implique tous les tissus de l'articulation incluant le cartilage articulaire, l'os sous-chondral, la membrane synoviale, la capsule articulaire, le liquide synovial et les ménisques. L'arthrose est une pathologie multifactorielle qui résulte principalement de la dégradation du tissu cartilagineux par perte de l'homéostasie entre des facteurs anaboliques et cataboliques où ces derniers prédominent (Figure 11 panneau B) (Goldring et al., 2008).

Les forces mécaniques modulent l'activité métabolique des chondrocytes (Sah et al., 1989). Toutefois, lorsque l'impact dépasse un seuil critique, des lésions au niveau du cartilage peuvent apparaître (Villanueva et al., 2010). Lors de trauma ou d'inflammation, les changements métaboliques des chondrocytes jouent un rôle primaire dans la physiopathologie de l'arthrose (Phadke 1983). Plusieurs facteurs de croissance sécrétés par les chondrocytes, mais aussi par l'os sous chondral et la membrane synoviale ont été identifiés comme facteurs anaboliques, le TGF $\beta$  et l'IGF-1 vont stimuler la synthèse des protéoglycanes, tentant de contribuer à la réparation cartilagineuse (Lum et al., 1996; Martel-Pelletier et al., 2008). Par contre, le TGF $\beta$  contrairement à l'IGF-1, est aussi à l'origine de la formation d'ostéophytes (van Beuningen et al., 1994). Cependant, la sécrétion de ces facteurs de croissance n'est pas suffisante pour contrebalancer l'effet des protéases et des cytokines altérant le métabolisme des chondrocytes (Hardingham et al., 1992; Martel-Pelletier et al., 2008).

La déplétion des molécules de la matrice extracellulaire (collagène et agrécanes) est due à un ensemble de facteurs cataboliques tels que des protéases, des cytokines et des PGs synthétisées essentiellement par les chondrocytes, mais aussi par la membrane synoviale ou les ostéoblastes de l'os sous-chondral (Martel-Pelletier et al., 2008; Troeberg et al., 2012).

Parmi les protéases, plusieurs enzymes participent à la dégradation de la matrice extracellulaire composée de collagène et de protéoglycanes : les MMPs et les agrécanases. Les MMPs, notamment les collagénases (MMP-1, -8, -13, -14), les gélatinases (MMP-2, -9), la stromélysine-1 (MMP-3) et les MMP-14, -15, -16, -18 et -28, induisent la dégradation du collagène (Martel-Pelletier et al., 2008; Troeberg et al., 2012). Les agrécanases ou ADAMTS (une désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine), ADAMTS-4 et de façon plus prédominante les ADAMTS-5, sécrétées après stimulation de l'IL-1 $\beta$ , induisent la dégradation des agrécanes (protéoglycanes) (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005). Les synoviocytes participent aussi directement à la production de MMPs (particulièrement les MMP-1, -3, -9 et -13) (Martel-Pelletier et al., 2008; Troeberg et al., 2012). Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est augmenté dans la membrane synoviale favorisant l'angiogénèse (Walsh et al., 2007). La vascularisation de l'os sous-chondral provoque une apoptose ou une hypertrophie des chondrocytes et conséquemment, une déminéralisation de l'os sous-chondral montrant alors une diminution de son l'épaisseur et une



augmentation des ostéoclastes et des protéases dont la cathepsine K et la MMP-13 (Bertrand et al., 2010; Kwan Tat et al., 2010).

Les médiateurs de l'inflammation participent activement au dérèglement de l'homéostasie articulaire (Kapoor et al., 2011). Parmi les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  est un pivot de la destruction articulaire et il est le principal médiateur de l'activation enzymatique (Pujol et al., 1987). Il est exprimé dans le cartilage et la membrane synoviale. Ses effets sont multiples : il induit sa propre synthèse, augmente la synthèse des MMPs et inhibe la synthèse des substances inhibitrices naturelles des protéases; il stimule le système activateur plasminogène/plasmine ainsi que la synthèse et la libération d'éicosanoïdes (PGE<sub>2</sub> et leucotriène B<sub>4</sub>) (Amin et al., 2000). L'IL-1 $\beta$  diminue la synthèse du collagène de type II, mais augmente celle de type I et III donnant un collagène avec de moins bonnes qualités biomécaniques et participant donc à une mauvaise reconstruction cartilagineuse (Kolettas et al., 2001; Murakami et al., 2000). Le TNF- $\alpha$  agit de façon synergique avec l'IL-1 $\beta$  en augmentant la synthèse des MMPs et ADAMTS et la libération des cytokines, des PGs et du NO. L'activation des voies de signalisation intracellulaires NF- $\kappa$ B, c-Jun et p38, Wnt/ $\beta$  caténine et *hedgehogs* sont impliquées dans la pathogénèse de l'arthrose (Kapoor et al., 2011; Zhou et al., 2016).

D'autres cytokines pro-inflammatoires sont aussi sécrétées de façon autocrine par les chondrocytes et de façon paracrine par la membrane synoviale, mais le rôle de chacune d'elles n'est pas clairement identifié, parmi ces substances, on note l'IL-6, -8, -17, -18, le facteur inhibiteur de la leucémie et l'oncostatine. Certaines cytokines (IL-4, -10, -13) sont synthétisées par la membrane synoviale et les chondrocytes afin de diminuer la destruction du cartilage par une synthèse d'antagonistes des récepteurs de l'IL-1 $\beta$  et de protéines inhibitrices des MMPs et diminuent les autres médiateurs inflammatoires (Scanzello et al., 2012). La synthèse du NO par la NO synthase chondrocytaire diminue aussi le processus anabolique et augmente le processus catabolique (Lotz 1999). Le NO inhibe la synthèse des agrécanes et du collagène de type II et stimule l'activité des MMPs, il induit la synthèse de la COX-2 et des PGs (Notoya et al., 2000) et réduit la synthèse des antagonistes des récepteurs de l'IL-1 $\beta$ . La membrane synoviale synthétise et libère aussi des neuropeptides tels que la SP, la BK, le VIP et le NGF, participants au développement de l'arthrose et à la chronicisation de la douleur inflammatoire neurogène (Sellam et al., 2010).

De plus, l'activation des récepteurs de type Toll (TLR2 et TLR4) (Scanzello et al., 2008) du système immunitaire inné par des fragments du cartilage joue un rôle important également dans la progression de l'arthrose par l'activation du système du complément (Orlowsky et al., 2015) et d'une infiltration de macrophages, de cellules T et B *via* la voie NF- $\kappa$ B. Les macrophages de la membrane synoviale peuvent se différencier en ostéoclastes. Ils participent aussi à la formation des ostéophytes *via* le TGF- $\beta$  (Haseeb et al., 2013; van Lent et al., 2004).

D'autres facteurs contribuent aussi à la pathogenèse de l'arthrose outre des prédispositions génétiques (Felson et al., 1998; Loughlin et al., 2000). Chez des individus âgés, les chondrocytes augmentent leur production de cytokines pro-inflammatoires. Les AGEs sont impliqués dans ce processus (DeGroot et al., 2004). Les AGEs s'accumulent dans le cartilage articulaire des personnes âgées et lient les récepteurs des chondrocytes induisant la libération de cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance endothéliaux *via* la voie NF- $\kappa$ B et menant à la dégénération du cartilage (Rasheed et al., 2011). De plus, les adipokines (leptine, adiponectine, resistine, visfatine) et les cytokines sécrétées par le tissu adipeux et le corps adipeux infrapatellaire du genou, sont reliées à la dégradation du cartilage articulaire impliquant aussi le rôle de l'obésité dans le développement de l'arthrose (Conde et al., 2011; Thijssen et al., 2015).

#### **1.5.4 Les molécules médiatrices de la douleur liée à l'arthrose**

La douleur dans l'arthrose peut provenir du remodelage de l'os sous-chondral en raison de sa riche innervation (Orduna Valls et al., 2017). La douleur peut également provenir de l'inflammation initiale de la membrane synoviale (synovite) devenant progressivement fibrosée au fil du temps. La douleur reliée à l'arthrose provoque une sensibilisation des voies de la douleur en périphérie et central, générant des cibles thérapeutiques analgésiques potentielles (Malfait et al., 2013). Il y a plusieurs voies proposées afin d'expliquer les mécanismes de la douleur autres que de cibler l'inhibition de MMP-13 (Tardif et al., 2004) et ADAMTS5 (Glasson et al., 2005) afin de réduire la dégradation du cartilage ou bien l'utilisation des anti-inflammatoires, des opioïdes, des inhibiteurs de synthèse des PGs et leucotriènes (Alvaro-Gracia 2004) et des bloqueurs des canaux sodiques pour soulager la douleur (Malfait et al., 2013).

Tout d'abord, on note la protéine chimiotactique monocytaire de type 1 (MCP-1) ou bien CCL2 (chimiokine ligand 2) et son récepteur (CCR2). CCR2 est fortement exprimé sur les



monocytes, les cellules dendritiques et endothéliales et il a été clairement démontré que CCR2 joue un rôle essentiel dans l'inflammation neurogène (Conductier et al., 2010) par la migration des monocytes de la moelle osseuse et sanguins vers les sites d'inflammation (Tsou et al., 2007; Conductier et al., 2010). Des souris déficientes en CCR2 ont démontré une réduction de 70 % de leurs comportements douloureux suite à une injection intra-plantaire de formol. En revanche, une administration intraplantaire de son ligand, le CCL2, chez des souris sauvages a également induit de l'allodynie. En utilisant un autre modèle, celui de la douleur chronique (lésion du nerf sciatique), ces mêmes souris déficientes en CCR2 ont échoué à développer de l'allodynie mécanique comparativement aux souris de type sauvages (Abbadie et al., 2003). Cette perte d'allodynie a été associée à une diminution de l'infiltration des monocytes/macrophages dans le ganglion de la racine dorsale du nerf sciatique ainsi que moins d'activation de la microglie dans la moelle épinière. Il est rapporté dans la littérature que la production de CCL2 provenant de chondrocytes de patients arthrosiques était augmentée en comparaison avec des chondrocytes provenant d'un patient normal. Cette augmentation de CCL2 était supérieure lorsque stimulée avec l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Yuan et al., 2001). Les concentrations de CCL2 dans le sang et le liquide synovial sont augmentées chez des patients souffrants d'arthrose et corrélées à la sévérité de la maladie (Li et al., 2015). Il est évident que le complexe CCL2/CCR2 joue un rôle direct dans l'excitabilité des neurones nociceptifs et de l'activation de la microglie menant à une hyperalgésie et une allodynie persistante et offrant des nouvelles cibles thérapeutiques (Chen et al., 2017).

Celui offrant le plus d'ouverture thérapeutique en ce moment pour soulager la douleur reliée à l'arthrose, semble être le blocage du complexe formé du NGF et son récepteur (TrkA). L'administration systémique de NGF induit une hyperalgésie persistante des muscles du corps chez des patients sains (Petty et al., 1994), contrairement aux effets analgésiques d'une administration d'anticorps anti-NGF (tanezumab) pour des patients souffrants de douleur reliée à l'arthrose (Brown et al., 2012; Lane et al., 2010), mais plus enclins aux fractures osseuses par surexpression de l'arthrose suite au soulagement de la douleur (Hochberg 2015). Si l'apparition de cet effet secondaire avait amené la FDA à arrêter les essais cliniques, ils ont repris depuis 2015 en précisant les patients sur lesquels utiliser cette thérapie, et les conditions de son utilisation (non concomitante à un AINS).

## 1.6 Résumé et énoncé des buts, hypothèses et objectifs de recherche

Le complexe douleur comprend un processus primaire et sensoriel, la nociception, auquel se rajoutent des réactions de défense et d'alarme psychophysiologiques. Ceci conduit au développement d'une véritable mémoire de la douleur, individuelle et modulée (plasticité neuronale) par des expériences précédentes de douleur incluant, entre autres, des phénomènes d'hypersensibilisation nociceptive. La sensibilisation centrale, aussi connue comme l'hyperalgésie secondaire, est présente lorsque l'origine de la douleur provient des mécanismes centraux. C'est une réponse accrue des nocicepteurs du SNC à une stimulation afférente normale ou inférieure au seuil d'activation, facilitant le traitement nociceptif. L'augmentation de l'excitabilité membranaire, la facilitation de la conduction synaptique et la diminution des voies inhibitrices sont les principaux processus cellulaires impliqués dans cette sensibilisation centrale (Latremoliere et al., 2009).

La sensibilisation des nocicepteurs des fibres afférentes en périphérie par les médiateurs de la soupe inflammatoire accroît les influx nociceptifs au niveau central. Ces influx activent les neurones centraux des fibres C et A $\delta$  et, dans certains cas, les sensibilisent. Leur seuil d'activation étant à présent diminué fait en sorte qu'ils deviennent activés par des stimuli non douloureux appliqués à la lésion (allodynie) (Price et al., 1977). Les mécanismes de sensibilisation centrale comportent divers processus biochimiques tels que l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs spinaux dans la fente synaptique. L'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison présynaptique du neurone induit une entrée massive d'ions Ca<sup>2+</sup> dans la fibre engendrant l'exocytose de vésicules remplies de neuromédiateurs tels que la SP, le CGRP, le glutamate et plusieurs autres (Schaible et al., 2005), pouvant être quantifiés notamment par neuroprotéomique (Ferland, Pailleux, et al., 2011). Ces peptides libérés par les terminaisons centrales ont un effet excitateur sur les neurones de la moelle épinière en agissant sur des récepteurs spécifiques.

Ces liaisons sur la membrane du neurone postsynaptique activent des seconds messagers des voies de signalisation intracellulaires menant à une augmentation de la transcription de certains gènes tels que c-FOS et/ou c-JUN, amplifiant donc le phénomène d'hypersensibilisation centrale. Une autre voie de la sensibilisation centrale implique les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  (Zelenka et al., 2005) et une interaction avec la microglie pouvant

activer la production de PGs dans le SNC par stimulation de l'enzyme COX-2. L'utilisation des AINSs traditionnels cible cette voie des PGs dans des pathologies telle que l'arthrose depuis très longtemps, puisque le développement de nouveaux traitements dans ce domaine est très restreint.

Il est donc d'un grand intérêt d'identifier des marqueurs pouvant devenir de nouvelles mires pharmacologiques analgésiques ou biomarqueurs d'un état douloureux et/ou pathologique. Jusqu'à maintenant, la perception de la douleur et de son intensité chez les animaux est en grande partie subjective. L'importance de développer des modèles animaux pour l'étude de la douleur est essentielle afin de permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et de rendre l'évaluation de la douleur plus objective. Il est aussi d'une importance capitale de développer et valider des outils d'évaluation de la douleur fiables et reproductibles afin de permettre une translation des résultats des animaux vers l'humain. L'utilisation de la protéomique jumelée avec des méthodes d'évaluation subjective afin de quantifier la douleur pourrait permettre une gestion complètement nouvelle de la douleur et du bien-être animal.

Ainsi, les hypothèses de recherche de mon programme étaient :

- (i) La réponse à cette hypersensibilisation peut être détectée, élucidée et quantifiée, particulièrement au niveau du protéome spinal.
- (ii) Une gestion adéquate de la douleur atténue l'hypersensibilisation et ses conséquences morbides.

Les objectifs :

- (i) Caractériser les atteintes du protéome spinal en fonction du niveau de douleur perçu par l'animal.
- (ii) Identifier le (les) marqueur (s) potentiellement modulé (s) par l'hypersensibilisation nociceptive dans des modèles expérimentaux de douleur bovine, canine et murine.

Pour tester ces deux hypothèses, nous avons proposé une série d'approches expérimentales translationnelles. Tout d'abord, sur un modèle expérimental de douleur viscérale chez la vache, les méthodes d'évaluation comportementale et physiologique de la douleur en termes de spécificité, sensibilité et reproductibilité ont été validées par une autre étudiante, Dre Pascale Rialland. J'ai donc profité de ce modèle sur la vache laitière pour étudier de manière

exhaustive les marqueurs neuroprotéomiques de la douleur. Ainsi, j'ai été apte à dresser un portrait phénotypique et neuroprotéomique de la douleur viscérale chez la vache. La quantification des biomarqueurs identifiés dans le modèle bovin a par la suite été validée sur un modèle canin avec douleur arthrosique chirurgicale. Ces deux études ont fait partie de mes travaux pendant mes études à la Maitrise avant mon passage direct au Doctorat. Pour la poursuite de mes études au troisième cycle supérieur, la validité ainsi que la sensibilité psychométrique des méthodes d'évaluation algésimétriques et biomécaniques de la douleur ont été testées sur un modèle de douleur arthrosique (*via* l'injection IA de MIA) murin. L'impact au niveau du protéome spinal des différents stades de la douleur arthrosique générée par le MIA IA ainsi que son expression temporelle et ses éventuelles modifications suite à différents traitements pharmacologiques (lidocaïne IA, carprofène ou morphine sous-cutané et prégabaline en traitement préventif ou curatif *per os*) ont été évaluées. Ces mêmes neuromédiateurs et méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur ont été également testés sur des modèles chirurgicaux murins (caractérisation du modèle chirurgical en comparaison avec le modèle chimique MIA) d'induction de la douleur arthrosique, afin d'augmenter la validité et la fiabilité de ce modèle.

De ces hypothèses et objectifs, plusieurs manuscrits ont été élaborés et publiés, ayant comme but commun de :

- (i) Développer et valider des biomarqueurs neuroprotéomiques (Publications des sections 2.1 à 2.6).
- (ii) Développer et valider des outils d'évaluation de la douleur chronique viscérale chez la vache laitière. Dans cette étude, seulement la portion de l'analyse neuroprotéomique fait partie de mes travaux et résultats à la Maitrise (Publication de la section 2.1).
- (iii) Établir une association entre la douleur centrale et les symptômes de l'arthrose canine à l'aide d'un médicament non-analgésique. Idem au but (ii) (Publication de la section 2.2).
- (iv) Comparer différentes méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur en relation avec l'expression de différents neuropeptides spinaux dans des modèles de douleur chroniques arthrosiques chez le rongeur. (Publications des sections 2.3 à 2.6).

## 2. Publications

### 2.1 Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: a pilot, prospective, blinded, randomized and controlled study focusing on spinal pain proteomics

Cet article, publié dans *Journal of Dairy Science*, a permis dans un premier temps, d'identifier un nouveau marqueur neuroprotéomique de la douleur liée à la sensibilisation centrale dans le LCR et modulée selon le niveau d'analgésie. Le but de cet article était de valider différentes méthodes d'évaluation de la douleur aiguë et chronique, en réponse à trois traitements pharmacologiques analgésiques, suite à une réticulopéritonite traumatique chez des vaches laitières.

La validation des méthodes d'évaluation comportementale et physiologique de la douleur en termes de spécificité, sensibilité et reproductibilité faisait partie intégrante des travaux de recherches de la thèse du Dre Pascale Rialland. Pour ma part, j'ai utilisé ce modèle pour étudier de manière exhaustive les marqueurs neuroprotéomiques de la douleur pour la première fois et ainsi me permettre d'identifier la TTR dans le LCR. Ainsi, j'ai été apte à dresser un portrait phénotypique et neuroprotéomique de la douleur viscérale chez la vache selon le niveau d'analgésie. En effet, cet article supporte le fait que la mesure de la TTR dans le LCR semble avoir le potentiel d'améliorer la sensibilité de détection d'une réponse à une thérapie analgésique chez les vaches laitières souffrant de douleur chronique.

Mme Colombe Otis a participé aux analyses neuroprotéomiques à partir du LCR, soit à l'élaboration, au développement et à l'exécution des méthodologies d'identification sur gel électrophorèse, d'extraction et de digestion tryptique protéinique, de semi-quantification puis finalement, d'identification de la TTR dans le LCR de vache en collaboration avec le laboratoire du Dr Francis Baudry. Pour la rédaction du manuscrit, elle a assisté la Dre Rialland dans les analyses statistiques et elle a participé activement à la recherche littéraire, l'infographie ainsi qu'à la rédaction des sections concernant la portion d'analyse neuroprotéomique.

**Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: a pilot, prospective, blinded, randomized and controlled study focusing on spinal pain proteomics**

Pascale Rialland<sup>1</sup>, Colombe Otis<sup>1</sup>, Marie-Luce de Courval<sup>1</sup>, Pierre-Yves Mulon<sup>2</sup>, Denis Harvey<sup>2</sup>, Sylvain Bichot<sup>1</sup>, Dominique Gauvin<sup>1</sup>, Alexander Livingston<sup>3</sup>, Francis Beaudry<sup>1</sup>, Pierre Hélie<sup>2</sup>, Diane Frank<sup>2</sup>, Jérôme RE del Castillo<sup>1</sup>, Eric Troncy<sup>1</sup>

**2.1.1 Abstract**

Few studies have previously verified the validity of the behavioral and physiological methods of pain assessment in cattle. This prospective blinded randomized controlled experimental study aimed to validate different methods of pain assessment during acute and chronic (up to 21 days post-intervention) conditions in dairy cattle, in response to three analgesic treatments for traumatic reticuloperitonitis. Cerebrospinal fluid (CSF) biomarker and mechanical sensitization were measured as indicators of centralized pain. Proteomics in the CSF were examined to detect specific (to pain intensity) and sensitive (responsive to analgesia) markers. Recordings of spontaneous behavior with video-analysis, telemetered motor activity (MA), pain scales, electrodermal activity (EDA) and plasma cortisol concentration were quantified at regular intervals. Cows were assigned to group 1 (n = 4, standard control receiving aspirin), group 2 (n = 5, test group receiving pre-emptive tolfenamic acid) and group 3 (n = 3, positive control receiving pre-emptive multimodal analgesia comprised of epidural morphine, as well as tolfenamic acid and butorphanol). Rescue analgesia was administered as needed.

---

<sup>1</sup>Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Department of Biomedical Sciences, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Department of Clinical Sciences, Department of Pathology and Microbiology, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe (Quebec) J2S 7C6

<sup>3</sup>Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon (Saskatchewan) S7N 5B4

Generalized estimating equations tested the group differences and influence of rescue analgesia on the measurements. All three groups demonstrated a long-term decrease in a CSF protein, identified as transthyretin (TTR). The decrease in TTR expression inversely correlated with the expected level of analgesia (group 1 < 2 < 3). Moreover, in group 1, CSF noradrenaline decreased long-term; cows were hypersensitive to mechanical stimulation, and demonstrated signs of discomfort with higher MA and ‘agitation while lying’ recorded from video-analysis. Decreased ‘feeding behavior’, observer-reported pain scales, EDA and plasma cortisol concentration were punctually able to differentiate pain intensity between groups. In summary, changes in CSF biomarkers and mechanical sensitization reflected modulation of central pain in dairy cows. The spontaneous behavior ‘agitation while lying’ was the only behavioral outcome validated for assessing acute and chronic pain in this visceral pain model.

### **2.1.2 Keywords**

Pain metrology, Animal behavior, Central sensitization, Pre-emptive multimodal analgesia

### **2.1.3 Introduction**

Visceral pain is considered one of the most painful clinical conditions in adult cattle (Laven, Huxley et al., 2009; Huxley and Whay 2006). In addition, there is a paucity of knowledge relevant to chronic pain mechanisms in dairy cattle (Walker, Duffield et al., 2011). It is highly difficult to develop new analgesic treatments for cows in the absence of a validated method of pain assessment that integrates the basic scientific knowledge of central pain mechanisms in this species. The overall challenge is therefore to investigate which pain mechanism(s) is(are) associated with a specific clinical condition, in particular to relate it(them) to signs and pain symptoms in cattle. This is even more crucial for visceral pain, such as that caused by traumatic reticuloperitonitis (TRP). The signs of the naturally occurring TRP disease are consistent with a localized peritonitis and include anorexia, fever, tachypnea, and an arched stance with abducted elbows (indicating cranial abdominal pain). Acute and chronic TRP has never been investigated, to the best of our knowledge, in a bovine pain study. Therefore, this study represents an original opportunity to establish the validity of usual methods of bovine pain assessment in this specific visceral pain model.

Pain evaluation in cattle has generally been studied in the context of routine livestock husbandry and surgical procedures, and clinical disease states. For example, husbandry procedures (Molony, Kent et al., 1995; Stafford and Mellor 2005), orthopedic lameness (Laven, Huxley et al., 2009; Huxley and Whay 2006), inflammatory diseases (Kemp, Nolan et al., 2008; Rasmussen, Fogsgaard et al., 2011), and abdominal procedures (Mialon, Deiss et al., 2012) induce pain of variable intensity. Accordingly, physiologic measures related to the sympathetic system, such as the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity (reflected by heart rate as well as plasma cortisol and catecholamine alterations), behavioral (spontaneous and nocifensive) responses and general bodily functions (such as food intake, weight gain, milk balance or energy balance) have been used to assess pain in cattle. In general, only the methods comprised of dosage of cortisol and objective measurements of behavioral changes have led to the approval of analgesic drugs in cattle, such as lidocaine, xylazine, and many non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). Therefore, the determination of the clinical validity of these models has largely been based on the pharmacological responsiveness of the aforementioned analgesic drugs (Baldrige, Coetzee et al., 2011; Stafford and Mellor 2005). Nevertheless, stress and handling of cattle might be major confounding factors in the evaluation of pain and analgesic responses (Stilwell, Carvalho et al., 2010; Baldrige, Coetzee et al., 2011; Mialon, Deiss et al., 2012) thus decreasing the ability to detect pain, and in consequence the real efficacy of the tested analgesic. Indeed, the interpretation of bovine physiologic and behavioral changes in terms of the individual animal's pain experience is therefore far from straightforward.

With the difficulty faced by veterinarians for appreciating pain mechanisms, proteomic (analysis of proteins) technologies could be helpful to gain insight into pain, proteomics being the link between genes, proteins, and disease. In pathological pain, proteome changes in the spinal cord might reflect corresponding protein regulatory modifications that are involved in the centralized pain sensitization (Kunz, Tegeder et al., 2005). Interestingly, proteomic analysis of cerebrospinal fluid (CSF) has been used to identify biomarkers in human central nervous system disorders (Jahn, Wittke et al., 2011). Thus, identifying unique patterns of protein expression, or biomarkers, associated with centralized pain sensitization might be a promising area of pain diagnostics in cattle when compared (or in complement) to the usual behavioral and physiological methods that are not directly linked to the physiological pathways of the cells in the central nervous system. We propose that the identification of CSF proteins in pathological



pain conditions may serve as a sensitive and specific method to quantify pain. These methods have not been used in cattle to date, but have the potential for evaluating the neurophysiological changes underlying central pain mechanisms.

The purpose of the present study was to evaluate different methods quantifying pain intensities in cows following TRP induced by visceral surgery. Over a 21 day-period, the objective was to estimate the sensitivity (e.g. the ability to predict the responsiveness to analgesics) and specificity (e.g. the ability to detect negative outcomes) of several methods of pain assessment (CSF biomarkers, mechanical pain threshold (MPT), spontaneous behavior assessed using accelerometry and video-analysis, observer-reported pain using a visual analog scale (VAS), a veterinarian pain scale (VPS), and a technician pain scale (TPS), and two physiological measurements: electrodermal activity (EDA) and plasma cortisol) following surgical induction of TRP in conjunction with treatment with one of three analgesic protocols (each expected to provide a different level of analgesia). We hypothesized that the TRP surgery used to generate pain would induce significant changes detectable by all methods of pain assessment, the latter being able to distinguish three levels in pain intensity (group 1 > group 2 > group 3) as following: pre-emptive multimodal (multiple analgesic drug classes and potentially route administration) analgesia (used in group 3) would lead to smaller changes than would pre-emptive unimodal (anti-inflammatory) analgesia (group 2), and that the latter would lead to smaller changes than those seen with single postoperative aspirin administration (group 1).

## **2.1.4 Materials and methods**

### **2.1.4.1 Animals**

All procedures involving the use of animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (RECH-1261), and were consistent with the Canadian Council on Animal Care guidelines for animals' healthcare and management. Twelve healthy, lactating, Holstein cows of 4.8 (1.5) years [mean (SD)], weighing 654 (79) kg, were selected from the internal livestock of the Faculty of Veterinary Medicine (FMV – Université de Montréal, St.-Hyacinthe, QC, Canada), and from surrounding private farms. All cows underwent a thorough clinical examination, serum biochemical, and hematological analyses to rule out lameness,

mastitis, and the presence of either non-inflammatory or inflammatory disease. They were also assessed for pain using a VAS (Laven, Huxley et al., 2009). The cows underwent an acclimation period of 3 weeks prior to the study, at the FMV. They were housed in individual tie-stalls (neck-bar ties), on dry straw bedding that was changed daily. Room temperature was 23.4 (4.0) °C and air changes were not controlled. The cows were fed hay ad libitum and a concentrate mix (Synchro 6000, dairy ration 16 %, CO-OP, Montreal, QC, Canada) three times a day. The amount of concentrate to be fed to each lactating cow was calculated based on body weight (Conseil-Lait software 1996, Valacta, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) and did not exceed 6 kg per day. Water was supplied ad libitum. The cows were milked twice daily (at 05:30 AM and at 04:00 PM). Clinical evaluations were performed daily, at the time of milking.

#### **2.1.4.2 Study Design**

The design was a 2-phase study comprised of a 21-d baseline period (measurements at d -21, d-15, and d-7) followed by a surgically induced TRP pain on d0 at hour (h) 0, followed by a 21 d-period of visceral pain follow-up (**Figure 12**). Data recorded at d-7 were used as baseline values. The CSF sampling, MPT, accelerometry, video-analysis, pain scales (VAS, VPS, TPS), EDA, and plasma cortisol were recorded according to the timeframe (**Figure 12**). For CSF biomarkers and MPT, data from d1 to d8 were pooled to maximize the power of the analysis in a study of a pilot nature and were noted d1-8. Accelerometer and video-analysis were continuously recorded and analyzed over 24 h at each day of recording. All observers were blinded to group assignment.

Day (d)	-21	-15	-7	0						1	2	3	4	5	6	7	8	15	19	21					
hour (h) at d0 Timeline	---Baseline-->			-----Visceral Pain----->																					
Dairy Cows	↑ Inclusion			↑ TRP						↑ End															
Analgesia				↑ ↑ Analgesia						↑ ↑															
Group 1				P A						P P															
Group 2				T P						P T															
Group 3				T, M, B P						M T, M															
Pain outcomes	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑						
CSF TTR, NOR	*	*	*							(*)		(*)			(*)	*		*							
MPT	*	*	*							(*)		(*)			(*)	*		*							
Accelerometry	*	*	*							*	*		*					*							
Video-analysis	*	*	*							*	*		*					*							
VAS, VPS, TPS	*	*	*				*		*	*	*	*	*				*	*							
EDA	*	*	*				*		*	*	*	*	*			*	*	*							
Plasma cortisol	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*		*			*							

**Figure 12. Study design.**

Timeline shows activities from d -21 through d 21. TRP = traumatic reticuloperitonitis; CSF TTR, NOR = cerebrospinal fluid transthyretin and noradrenaline; MPT = mechanical pain threshold; VAS = visual analog scale; VPS = veterinarian pain scale; TPS = technician pain scale; EDA = electrodermal activity; \* = sampling or recording at the corresponding time; (\*) data from d 1 to 8 were pooled for the same pain outcome. Analgesia: A = intraruminal acetylsalicylic acid at a dose of 50 mg/kg; T = tolfenamic acid given intramuscularly at a dose of 2 mg/kg; M = epidural morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg; B = subcutaneous butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg; P = placebo.

The cows were randomly assigned to 1 of 3 treatment conditions. Group 1 cows ( $n = 4$ ) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid (Vetoquinol Canada Inc., Lavaltrie, QC, Canada) at d 0 (h 1). Group 2 cows ( $n = 5$ ) received unimodal analgesia comprising an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid (Vetoquinol SA, Lure, France), administered 2 h before surgery on d 0 (h -2) and repeated 4 h later (d 2). Group 3 cows ( $n = 3$ ) received preemptive multimodal analgesia that consisted of (1) i.m. tolfenamic acid at a dose of 2 mg/kg at h -2 and h 46; (2) epidural morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg (Laboratoire Chaix et Du Marais, Paris, France) at h -2 and repeated at h 22 and h 46; (3) s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg (Wyeth Animal Health, Guelph, ON, Canada) at h -2. Placebos in the form of 5 mL/100 kg of sodium chloride (Baxter Corporation, Toronto, ON, Canada) i.m., 15 mL of sterile water (Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada) epidurally, 1 mL/100 kg sodium chloride s.c., and flour powder were administered at h -2, h 22, and h 46 in cows that did not receive the corresponding (by dose and route of administration) analgesic drugs.

#### **2.1.4.3 Surgically induced traumatic reticuloperitonitis**

A standardized rumenotomy was performed *via* a left flank laparotomy in standing, nonsedated cows. Local anesthesia was achieved with a proximal paravertebral block using 60 to 80 mL of lidocaine (Vetoquinol Canada Inc.). After rumen incision, the gastric compartments were explored for the presence of foreign bodies. A 10-cm-diameter stainless steel circular claw was inserted into the muscularis tissue of the anteriomedial wall of the reticulum, without perforation. Surgery ended after a step-by-step process of cleaning and placing rumenal, peritoneum, muscle, and skin sutures. Postoperative care included daily disinfection of the wound for 6 to 8 d, a light diet for 2 to 3 d, and removal of skin sutures on d 7. The circular claw remained in place for 21 d. The cows were then euthanized with 40 mg/kg intravenous sodium pentobarbital (Bimeda-MTC Animal Health Inc.) and claw implantation was verified by postmortem examination.

#### **2.1.4.4 Rescue Analgesia**

Rescue analgesia (RA) was initiated based on live assessments completed every day. Cattle received RA when the sum of the values of the VAS (maximum = 100), VPS (maximum = 25), and TPS (maximum = 8) scores and EDA measurements (maximum = 10) surpassed a threshold of 71.5 (i.e., > 50 % of the total). Drugs for RA consisted of tolfenamic acid (2 mg/kg per 48 h, i.m.), butorphanol (0.1 mg/kg, s.c.), or both. The mean duration of postoperative analgesia was defined as the mean time from h 0 to the time at which RA was first required. The cumulative number of RA doses was recorded at each time point and used for further analyses.

#### **2.1.4.5 Cerebrospinal fluid biomarkers**

Approximately 5 mL of CSF was sampled following lumbar puncture performed with an 18-gauge × 70-mm needle attached to a 10-mL syringe. Any CSF sampling with trace blood was discarded and not analyzed further. The CSF collected was transferred into 3 prechilled tubes (Vacutainer, Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ) and stored at -80°C until assayed.

#### *2.1.4.5.1 Cerebrospinal fluid proteomic determination*

Protein detection was performed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as previously described (Laemmli 1970) with 25  $\mu$ L of CSF. The gel was then stained and destained with Coomassie Brilliant Blue R-250 solution (no.161-0436 and no.161-0438 for staining and destaining steps, respectively; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A single lane of gel around the mass of interest was cut into identical small pieces and in-gel tryptic digestion was performed according to the method of the trypsin profile in-gel digestion (IGD) kit (no. PP010; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Protein identification was performed by high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS). The observed ions mass/charge ( $m/z$ ) were surveyed using the MASCOT search engine ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) and data obtained were validated using mMASS 5.0 (Strohalm, Hassman et al., 2008). In silico collision-induced dissociation (CID) spectra were generated with mMASS 5.0 and compared with CID spectra generated with a HPLC-MS/MS system. The HPLC-MS/MS system is comprised of a Thermo Surveyor HPLC system and a Thermo Advantage Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA). Identification was based on a previous published method (Steen and Mann 2004).

For protein quantification, 15 KDa proteins on SDS-PAGE gel were visualized with an imaging system equipped with a cooled charge-coupled device (CCD) camera (Chemi genius2, Syngene; Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada). Semi-quantitative analysis was performed by densitometry using GeneTools software by Syngene (Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada). Protein quantity was evaluated relatively to the baseline CSF band density for each bovine sample.

#### *2.1.4.5.2 Cerebrospinal fluid catecholamine determination*

Briefly, the measurement of CSF noradrenaline by a HPLC system was based on a modification of the method of Remie and Zaagsma (Remie and Zaagsma 1986) as described by Hjemdahl (1988) the use of which has been reported (de Champlain, Karas et al., 2007). The detection limit for noradrenaline was 10 pg/mL. The typical recovery was 98 % for noradrenaline.

#### **2.1.4.6 Mechanical pain threshold**

Mechanical pain thresholds were measured using a mechanical algometer adapted for use in cattle (Chambers, Waterman et al., 1994) with a 2-mm-diameter probe that has a gradual rate of application to the skin. The cut-off value was set at 22.0 N, as estimated from a preliminary study. The device was attached to the front (or back) of the cow's leg at the mid-metacarpal (tarsal) region. The MPT corresponded to the pressure recorded upon observing a clear behavioral response in the cow (kicking, lifting of the leg, stepping, or a postural change). The measurements were performed in triplicate in both front and rear sites on each leg, resulting in a collection of  $n = 24$  values for each cow, at each time point. A 2-min rest period was maintained between 2 successive mechanical stimulations. The sample ( $n = 12$  cows) median value of all MPT measurements ( $n = 24$  in each pain-free cow) recorded at d  $-7$  was the reference threshold of mechanical sensitivity. A leg was nonsensitive if its 6 readings were all above or equal to the reference threshold. The decreased number of nonsensitive legs per cow reflected sensitivity to mechanical pressure.

#### **2.1.4.7 Spontaneous behavioral measurements**

##### *2.1.4.7.1 Accelerometry*

The accelerometer is an automated device (Actical; Mini Mitter, Bio-lynx Scientific Equipment, Montreal, QC, Canada) with a bi-directional microchip that quantifies motor activity (MA). Accelerometer recording has been shown to be reliable and valid recording of activity in dairy cows (Müller and Schrader 2005; Müller and Schrader 2003) and was responsive to NSAID in calves following dehorning (Theurer, White et al., 2012). The Actical accelerometer is sensitive to movements in the range of 0.35–3.5 Hz. Each device was attached to a halter at the level of the cow's neck, and in line with the vertebral axis from d-21 to d21. The accelerometer was initialized using 15-s epochs, so that a total number of 5760 values of MA (no unit) were registered at each time point (from 08:00:00 AM to 07:59:45 AM) for each cow. The average of the daily 5760 MA recordings was examined for the subsequent analysis.

#### 2.1.4.7.2 *Automated Video-Analysis*

Automated video recording was performed using a webcam camera positioned in front of the cows. For every cow, fourteen 5-minute samples were recorded, at 08:00 and 09:00 AM, at 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 20:00, 21:00, 22:00 PM, and at 02:00, 03:00, 04:00, 06:00 and 07:00 AM per day of evaluation. An ethogram was constructed based on data from the literature (Krohn 1994; Krohn and Munksgaard 1993; Fogsgaard, Røntved et al., 2012) and our own experience (**Tableau II**). Behavior occurrence was quantified by one blinded observer using analysis software (The Observer Version 3.0; Noldus, Tracksys Ltd., Nottingham, United Kingdom). Briefly, a count of one was assigned each time an event of a coded behavior occurred (frequency) throughout a total time of 70 min per 24 h. The counts of each behavior were summed and used for further analysis.

**Tableau II. Ethogram of dairy behavioral observations (video analysis).**

<b>Behavior<sup>1</sup></b>	<b>Definition</b>
Standing	The cow stands on all its 4 limbs
Lying	The cow's body is resting in contact with the floor (on the right or left side)
Transition	The cow moves from kneeling to lying down with the body resting in contact with the floor
Agitation while lying	While lying down, the cow stretches a leg, steps, kicks or changes position without going from lying to standing or from one side to the other
Agitation while standing	While standing, the cow stretches a leg, kicks, or changes weight bearing limb, position, without going from standing to lying
Head, high (Forward turned)	The cow's head is at a level just above the shoulder; or The cow's neck is either held forward or turned backward
Head, low (Forward turned)	The cow's head is below the shoulder or touching the floor; or The cow's neck is either held forward or turned backward and rests on her body or the floor
Teeth	Grinding the teeth
Lips	Licking the lips
Lick muzzle	Sweeping the tongue over the upper lip and/or nostril
Lick wound	Licking the surgical incision site (left flank)
Self-grooming	Rubbing the head or any parts of the body against other body parts or stall fixtures, or licking body parts (except the area of the surgical incision site)
Feeding behavior	Pushing the muzzle into feed, chewing feed
Rumination	Regurgitation, chewing, and swallowing of previously eaten feed
Drinking	The cow's muzzle is positioned in the drinking bowl
Idle	The cow is inactive
Disturbed by human	A human is present in the cow's stall or a neighboring stall, or the cow is milked or tightly tethered
Social interaction	The cow interacts with its neighbor (has her head outside her own stall, or licks or threatens her neighbor)
No interest	The cow shows no interest in its neighbor

<sup>1</sup>Standing, lying, and transition behaviors are mutually exclusive. For head, high and head, low: head and neck position choices are mutually exclusive. "Disturbed by human" and "no interest" are environmental factors. Each behavior recording takes into account all of body position, head and neck position, and environmental factors.



### 2.1.4.8 Observer-reported pain measures

One observer assessed the cow's pain using the VAS, a 100-mm horizontal line ranging from 0 (no pain) to 100 (most severe pain), and the VPS, a composite pain scale, which ranged from 0 (no pain) to 25 (severe pain), (**Tableau III**). A second observer completed the TPS, which comprised 8 dichotomous items (presence = 1 or absence = 0; **Tableau IV**); thus, TPS scores ranged from 0 (no pain) to 8 (severe pain).

**Tableau III. Veterinarian Pain Scale<sup>1</sup> used in this cow study.**

Parameter	Definition	Score
VPS-T <sup>2</sup> (temperature)	<0.5°C change from that at initial exam	0
	<1°C change, but >0.5°C	1
	<1.5°C change, but >1°C	2
	>1.5°C change	3
VPS-HR <sup>2</sup> (heart rate)	Normal compared with initial exam (<5%)	0
	5 to 30% increase	1
	31 to 50% increase	2
	>50% increase	3
VPS-RR <sup>2</sup> (respiratory rate)	Normal compared with initial exam (<5%)	0
	5 to 30% increase	1
	31 to 50% increase	2
	>50% increase	3
VPS-BP <sup>2</sup> (mean arterial blood pressure)	Normal compared with initial exam (<5%)	0
	5 to 30% increase	1
	31 to 50% increase	2
	>50% increase	3
VPS-A (attention)	Looks at the observer, then comes back to original activity	0
	Looks at the observer, follows glance, no return to original activity	1
	Head down, shunning the observer	2
	No reaction, remains motionless	3
VPS-WP (withers pinch)	Drops withers/back, then resumes normal posture and activity	0
	Drops withers/back, then leans forward, then resumes normal posture and reduced activity	1
	Drops withers/back, then leans forward, and does not resume activity	2
	Does not drop withers/back in response to pinch	3
VPS-App (appetite)	Normal, usual appetite	0
	Decreased appetite	1
	No appetite	2
VPS-Face (facial expression)	Calm, low head, ears pricked	0
	Calm, occasional movements of the head, ears pricked and folded	1
	Occasional ear movements from front to rear, occasional grimace <sup>3</sup>	2
	Continuous ear movements from front to rear, continuous grimace <sup>3</sup>	3
VPS-Post (posture)	Carries weight on a limb, balanced on its four legs, normal sternal recumbency	0
	Occasional stamping, pacing, moves over frequently	1
	or Prostration, motionless	
	Frequent and repeated stamping, frequent (continuous) head and thorax movements	2
or Abnormal lying posture (legs apart, with no weight bearing), head down, depressed		

<sup>1</sup>The VPS was constructed with parameters relating to physiological changes based on temperature (VPS-T), heart rate (VPS-HR), respiratory rate (VPS-RR), and mean arterial blood pressure recording (VPS-BP), interactive behavior [attention (VPS-A) and response to withers pinch (VPS-WP)], and well-being [appetite (VPS-App), facial expression (VPS-Face), and posture (VPS-Post)].

<sup>2</sup>Physiologic changes were scored according to the percentage of change compared with values obtained at d -7.

<sup>3</sup>Nose movements, eyebrow movements, rictus, wince.

**Tableau IV. Technician Pain Scale used in this cow study.**

Item	Present	Absent
Not approaching food	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Not eating	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Not ruminating	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Abnormal posture	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Unusual behavior when close to the observer	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Fear or avoidance	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Vocalization or teeth grinding	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Aggressiveness	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
Total score <sup>1</sup>		_____ / 8

<sup>1</sup> Technician Pain Scale scores ranged from 0 (no pain) to 8 (severe pain)

#### **2.1.4.9 Physiological and pathological measurements**

The determination of EDA (Pain Gauge; Public Health Information Systems Inc., Dublin, OH, USA) has been described previously (Baldrige, Coetzee et al., 2011). Briefly, the 2 electrodes of the device were applied on a cleaned and dried (with isopropyl rubbing alcohol, 70 %) area of skin at the base of the tail. A 2-min delay ensured alcohol evaporation before EDA measurement. The dermal conductance recorded on the skin was converted into a numerical EDA (no unit) ranging from 0.1 (absence of pain or stress) to 9.9 (intense pain). Readings were obtained in triplicate and averaged for analysis.

Jugular blood samples were collected into 5-mL heparinized tubes, refrigerated for 2 hours, and processed within 3 hours of blood collection. Determination of plasma cortisol concentration was carried out using a radioimmunoassay technique (Coat-A-Count; Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA, USA) at the biochemistry and endocrinology laboratory (Diagnostic Service, FMV – Université de Montréal, St.-Hyacinthe, QC, Canada). Quantification of food consumption and dairy production (milk quantity and quality) and standard clinical evaluations were conducted daily. A certified pathologist (FMV – Université de Montréal, St.-Hyacinthe, QC, Canada) realized the autopsy.

#### 2.1.4.10 Data and Statistical Analyses

First, the reliability of assessment methods was tested over the baseline period: nonparametric Friedman tests for repeated measures were calculated for each measure recorded at the 3 time points: d -21, d -15, and d -7. Because none of the methods had any significantly different values, measurements were considered reliable (data not shown). Only d -7 values served as the baseline reference for subsequent analyses.

The mean duration of postoperative analgesia was analyzed with a Kruskal-Wallis test followed by a Wilcoxon-Mann-Whitney test. The Fisher exact test was conducted to evaluate the occurrence rate for required doses of RA. The number of doses of RA by time was presented using the cumulative mean distribution as a descriptive statistic.

The longitudinal data outcomes followed a Poisson distribution (for CSF biomarkers, number of nonsensitive legs, VAS, and plasma cortisol) and were analyzed with generalized estimating equations (GEE) for repeated measures with a logit link function. Cow was included as a repeated effect in the model. Negative binomial regression was applied when data were overdispersed (for video analysis, VPS, TPS, and EDA). A multivariate model was developed with time, group, interaction of group with time, and RA using Wald statistics. To adjust for multiple measurement times in each cow, we used a GEE model with an unstructured or exchangeable correlation matrix. We used the best quasi-likelihood under the independence model criterion for model comparison (Pan 2001). Model adequacy was verified using a thorough residual analysis (Ziegler, Kastner et al., 1998). The GEE model yielded estimates of the risk ratio (RR) for each permutation of the interaction term with a 95 % confidence interval (CI) of each exponentiated estimate. The  $\alpha$ -level was adjusted using the Bonferroni correction (original  $\alpha$ -value divided by the number of comparisons of interest). Thus, significant  $P$ -values were  $0.05/21 = 0.0023$  for CSF biomarkers, MPT, and cortisol,  $0.05/27 = 0.0018$  for MA and video analysis, and  $0.05/24 = 0.002$  for VAS, VPS, TPS, and EDA.

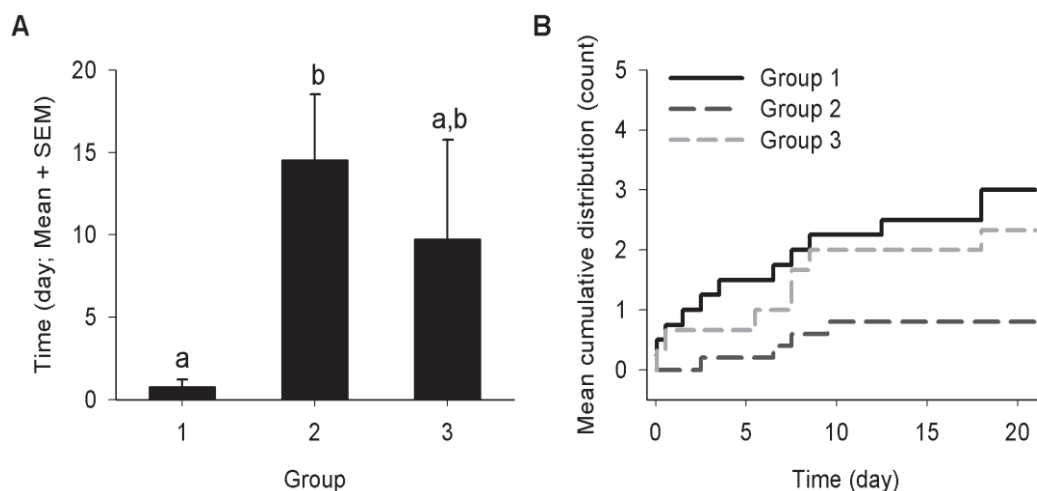
As an exploratory psychometric analysis, inter-item correlation coefficients were calculated for VPS and TPS. A correlation coefficient ranging between 0.20 and 0.80 was considered to indicate that items evaluated the same latent variable; that is, pain.

Data are reported as the median with (25–75 %) interquartile range, unless otherwise specified. Two-sided analyses with an  $\alpha$ -threshold of 0.05 were conducted using SAS software (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC).

## 2.1.5 Results

### 2.1.5.1 Rescue Analgesia

The mean duration of postoperative analgesia differed between groups [ $\chi^2$  (df): 6.09 (2),  $P = 0.03$ ] and was lower in group 1 than in group 2 [6.09 (1),  $P = 0.01$ ; **Figure 13** panel A]. We observed no significant difference when group 3 was compared with group 1 [1.59 (1),  $P = 0.21$ ] or group 2 [0.40 (1),  $P = 0.52$ ]. The occurrence rate of required doses of RA was not different between groups ( $P = 0.16$ ). The cumulative distribution of administered doses of RA is shown in **Figure 13** panel B and clearly highlights the difference of evolution between groups 1 and 2. For group 3, the variability was high because of the divergent response obtained in 1 cow compared with the other 2 in the group.



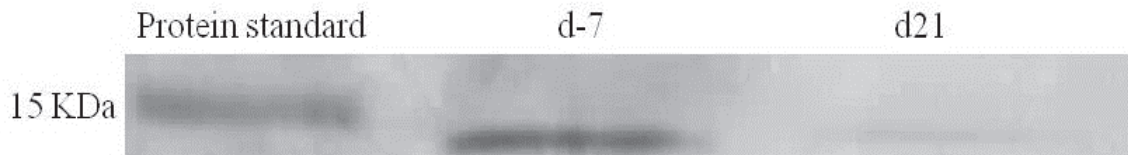
**Figure 13. Rescue analgesia.**

Rescue analgesia is presented with (A) mean time (day) from d 0 to the first required dose of rescue analgesia, and (B) the mean cumulative distribution of number of rescue analgesia doses over time. For the histogram of mean time, different letters (a, b) indicate significantly different values among treatment groups using the Wilcoxon-Mann-Whitney test. Bonferroni-corrected  $\alpha$  level was 0.016. Results are means  $\pm$  SEM. Group 1 cows ( $n = 4$ ) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows ( $n = 5$ ) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows ( $n = 3$ ) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.

## 2.1.5.2 Cerebrospinal biomarkers

### 2.1.5.2.1 Cerebrospinal proteomics

By using 1-dimensional SDS-PAGE to separate proteins from different CSF collection times according to their size, we observed a difference in the density for a band near 15 kDa (lane 1, **Figure 14**). This protein was downregulated in CSF samples postsurgery (lane 3, d 21) compared with CSF from baseline (lane 2, d -7) for a cow from group 1 (**Figure 14**). Five peaks were observed and mass/charge ( $m/z$ ) values of tryptic peptides were determined. Protein identification *via* tryptic peptide mass fingerprinting was performed using the MASCOT search engine, and the protein transthyretin (TTR) from *Bos taurus* (protein code: gi|27806789) provided the best fit. The protein contains 147 amino acids and the sequence coverage was 70 %. Moreover, CID spectra for all 5 tryptic peptides (30–51, 56–68, 69–90, 101–123, 124–146) were collected and the results were compatible with the tryptic peptide sequences, with  $\gamma$ - and  $\beta$ -type fragment ions predominating.

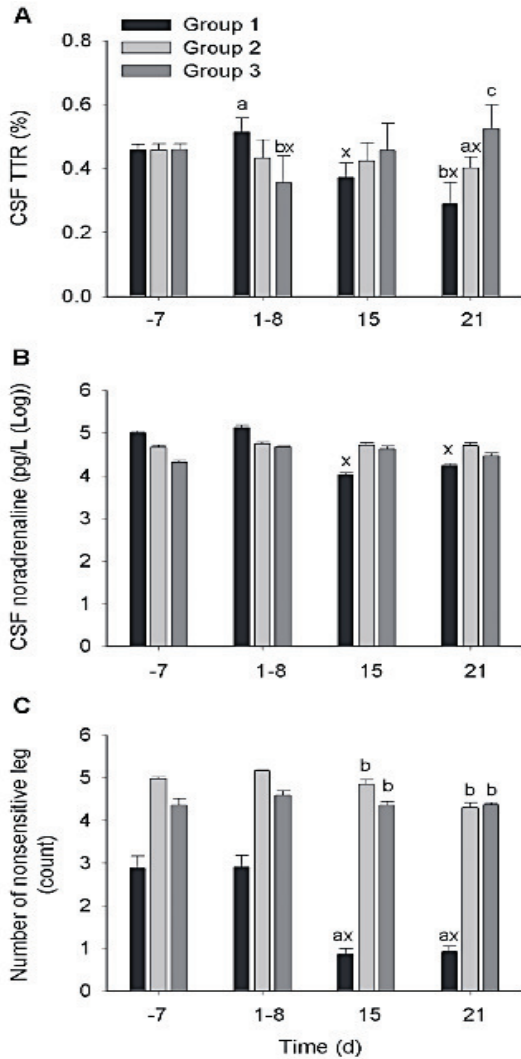


**Figure 14. SDS-PAGE image.**

Relative protein quantification with one-dimensional gel showing the difference in band density between 25  $\mu$ L of baseline cerebrospinal fluid (CSF) (lane 2, d -7) and 25  $\mu$ L of postsurgery CSF sample (lane 3, d 21) for a protein approximately 15 kDa (lane 1 = molecular weight standard).

For CSF TTR concentration, the GEE model analysis indicated significant effects for fixed factors (**Tableau V**). In group 1, relative to d -7, the RR of decreased CSF TTR was 1.23 (95 % CI = 1.09 to 1.37;  $P = 0.003$ ) and 1.58 (95 % CI = 1.36 to 1.84;  $P < 0.001$ ) at d 15 and 21, respectively (**Figure 15** panel A). Group 2 cows had 1.14 (95 % CI = 1.07 to 1.20;  $P = 0.0003$ ) times less TTR at d 21 relative to d -7. Group 3 cows had 1.29 (95 % CI = 1.09 to 1.52;  $P = 0.002$ ) times less TTR at d 1–8 compared with that at d -7, but the other time points did not differ from d -7. For the intergroup comparison, at d 1–8, group 1 cows had 1.44 (95 % CI = 1.19 to 1.75;  $P < 0.001$ ) times more TTR than those in group 3 (**Figure 15** panel A). Interestingly, at d 21, group 1 had 1.39 (95 % CI = 1.18 to 1.63;  $P < 0.001$ ) and 1.82 (95 % CI = 1.50 to 2.19;  $P < 0.001$ ) times less TTR than group 2 and group 3, respectively. In addition, group 2 had 1.30 (95 % CI = 1.10 to 1.53;  $P = 0.001$ ) times less TTR relative to group 3 at d 21

(Figure 15 panel A). We observed an inverse relationship between the CSF concentration of TTR and the pain hypersensitivity (see below) in this cattle pain model.



**Figure 15. Cerebrospinal biomarkers.**

(A) Cerebrospinal fluid (CSF) transthyretin (TTR), (B) CSF noradrenaline, and (C) number of nonsensitive legs by group over time (day). Data are presented as LSM estimates and SE for groups of n = 3 to 5 cows. Letter x denotes a significant difference compared with d -7; letters a-c indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected  $\alpha$  level was 0.0023. Results are LSM  $\pm$  SE. Group 1 cows (n = 4) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows (n = 5) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows (n = 3) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.

### 2.1.5.2.2 Cerebrospinal catecholamine

For CSF noradrenaline, the GEE model analysis indicated a significant effect for fixed factors, but an absence of group effect (**Tableau V**). In group 1, relative to d -7, the RR of decreased concentration of CSF noradrenaline was 1.24 (95 % CI = 1.09 to 1.41;  $P = 0.0007$ ) and 1.17 (95 % CI = 1.07 to 1.29;  $P = 0.0004$ ) at d 15 and 21, respectively (**Figure 15** panel B). Relative to d -7, CSF noradrenaline did not change with time in groups 2 ( $P = 0.61$  at d 1-8,  $P = 0.91$  at d 15, and  $P = 0.84$  at d 21) and 3 ( $P = 0.25$  at d 1-8,  $P = 0.52$  at d 15, and  $P = 0.36$  at d 21). We observed no significant difference between groups for CSF noradrenaline at any time point.

**Tableau V. Mixed linear regression models ( $P$ -value) for each of the pain outcomes for 12 Holstein cows and results of the planned comparison at baseline.**

Pain outcome <sup>1</sup>	$P$ -value				Rescue analgesia	Group difference <sup>2</sup> at baseline, relative risk (95% CI)
	Time (T)	Group (G)	T × G			
CSF TTR	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
CSF NOR	0.004	0.42	<.0001	<.0001	<.0001	
MPT	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
Accelerometry	<.0001	0.007	<.0001	<.0001	<.0001	Group 1 < Group 3 1.57 (1.18 - 2.08)
Agitation while lying	<.0001	0.0002	<.0001	0.17	0.17	
Feeding behavior	0.0002	0.007	<.0001	<.0001	<.0001	
Head low / forward	<.0001	0.50	<.0001	<.0001	<.0001	
Head high / turned	<.0001	0.25	<.0001	<.0001	<.0001	
VAS	0.25	0.29	<.0001	<.0001	<.0001	
VPS	<.0001	0.21	<.0001	<.0001	<.0001	
TPS	<.0001	0.57	<.0001	<.0001	<.0001	
EDA	<.0001	0.004	<.0001	<.0001	<.0001	
Plasma cortisol	<.0001	0.53	<.0001	<.0001	<.0001	

<sup>1</sup> CSF TTR = cerebrospinal fluid transthyretin; CSF NOR = cerebrospinal fluid noradrenaline; MPT = mechanical pain threshold; VAS = visual analog scale; VPS = veterinarian pain scale; TPS = technician pain scale; EDA = electrodermal activity.

<sup>2</sup> Group 1 cows (n = 4) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 3 cows (n = 3) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.



### 2.1.5.3 Mechanical pain threshold sensitivity

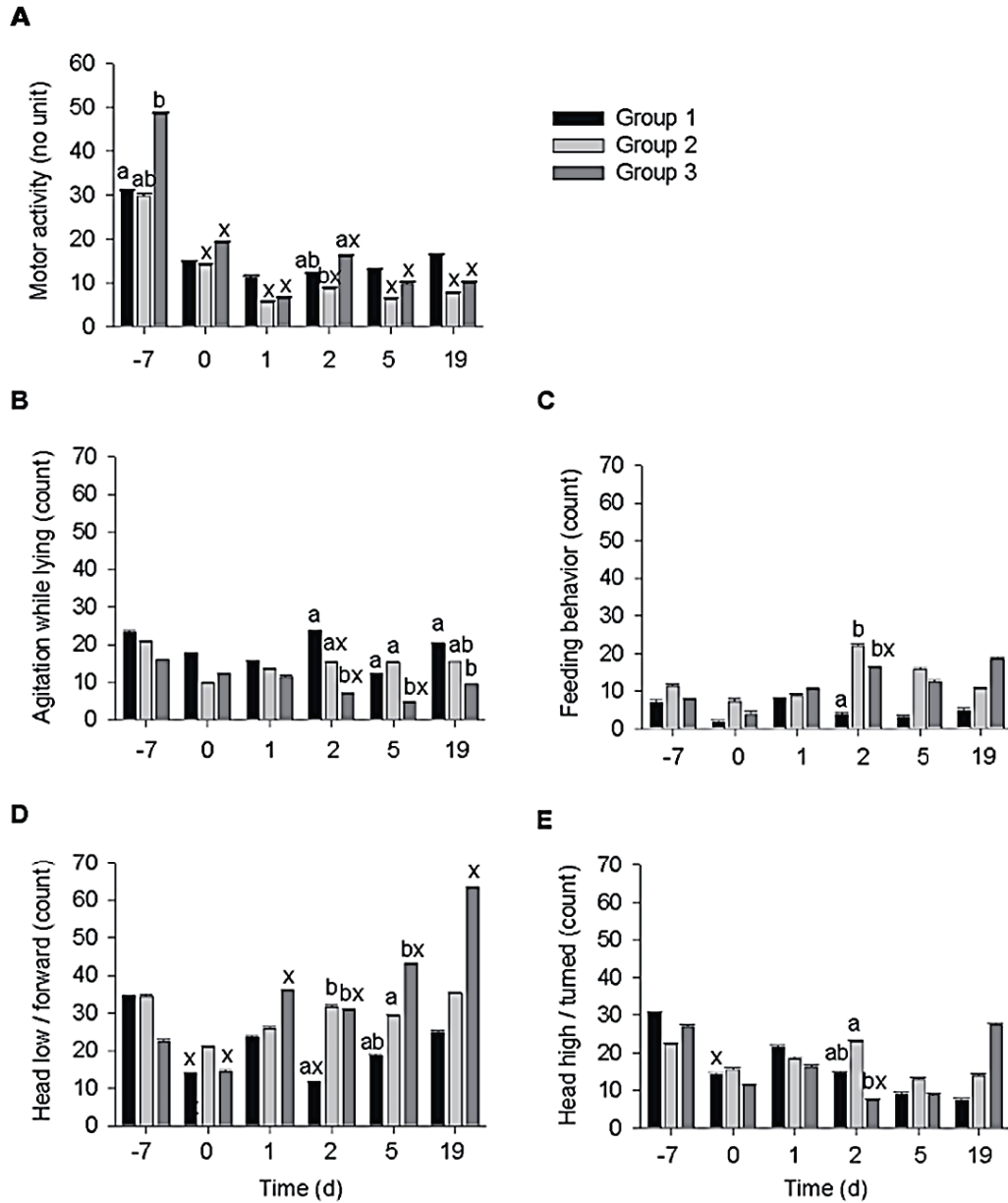
The reference threshold for sensitivity to MPT was 11.9 N at d -7. The number of nonsensitive leg(s) was equally distributed in each group at baseline (d -7). For the number of nonsensitive legs, fixed effects were significant in the GEE model analysis (**Tableau V**). Group 1 was 3.39 (95 % CI = 1.91 to 6.02;  $P < 0.001$ ) and 3.11 (95 % CI = 1.89 to 5.18;  $P < 0.001$ ) times more likely to develop hypersensitivity (a decrease in the number of nonsensitive legs) at d 15 and 21 relative to d -7, respectively (**Figure 15** panel C). We found no significant change with time for groups 2 and 3. At both d 15 and 21, group 1 cows were hypersensitive compared with group 2 (RR = 5.71, 95 % CI = 2.54 to 8.29;  $P < 0.001$ , and RR = 4.67, 95 % CI = 3.33 to 6.57;  $P < 0.001$ , respectively) and group 3 (RR = 5.18, 95 % CI = 3.62 to 7.26;  $P < 0.001$ , and RR = 4.75, 95 % CI = 3.68 to 6.11;  $P < 0.001$ , respectively; **Figure 15** panel C).

### 2.1.5.4 Spontaneous Behavioral Measurements

#### 2.1.5.4.1 Accelerometry

For daily MA, the GEE model analysis indicated main effects for fixed factors (**Tableau V**). At d -7, group 3 cows were 1.57 (95 % CI = 1.18 to 2.08;  $P = 0.0018$ ) times more active than cows in group 1. For both groups 2 and 3, MA was lower at d 0 ( $P = 0.0005$  and  $P < 0.001$ ), d 1 (both  $P < 0.001$ ), d 2 (both  $P < 0.001$ ), d 5 (both  $P < 0.001$ ), and d 19 (both  $P < 0.001$ ) compared with d -7. At d 2, group 3 cows were 1.97 (95 % CI = 1.35 to 2.86;  $P < 0.001$ ) times more likely to increase MA than group 2 cows (**Figure 16** panel A).





**Figure 16. Spontaneous behavioral measurements.**

(A) Motor activity and the spontaneous behaviors (B) lying with agitation, (C) feeding behavior, (D) head low/forward, and (E) head high/turned by group over time. Data are presented as LSM estimates and SE for groups of  $n = 3$  to 5 cows. Letter x denotes a significant difference compared with d -7; letters a and b indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected  $\alpha$  level was 0.0018. Results are  $LSM \pm SE$ . Group 1 cows ( $n = 4$ ) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows ( $n = 5$ ) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows ( $n = 3$ ) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.

#### 2.1.5.4.2 Automated Video-Analysis

The GEE model allowed planned comparison analysis of the following spontaneous behaviors: “agitation while lying,” “feeding behavior,” “head low/forward,” and “head high/turned” (**Tableau II** and **V**).

In both groups 2 and 3, the occurrence rate of “agitation while lying” was lower at d 2 relative to d -7 ( $P = 0.0003$  and  $P < 0.001$ , respectively; **Figure 16** panel B). The occurrence rate of “agitation while lying” was also lower at d 5 relative to d -7 in group 3 ( $P < 0.001$ ). Group 1 cows had 3.35 (95 % CI = 2.05 to 5.47;  $P < 0.001$ ), 2.79 (95 % CI = 1.44 to 5.13;  $P = 0.002$ ), and 2.13 (95 % CI = 1.48 to 3.07;  $P < 0.001$ ) times more events of “agitation while lying” than those in group 3 at d 2, 5, and 19, respectively (**Figure 16** panel B). Group 2 also had 2.19 (95 % CI = 1.80 to 2.67;  $P < 0.001$ ) and 3.40 (95 % CI = 1.73 to 6.65;  $P < 0.001$ ) times more events of “agitation while lying” than group 3 at d 2 and 5, respectively.

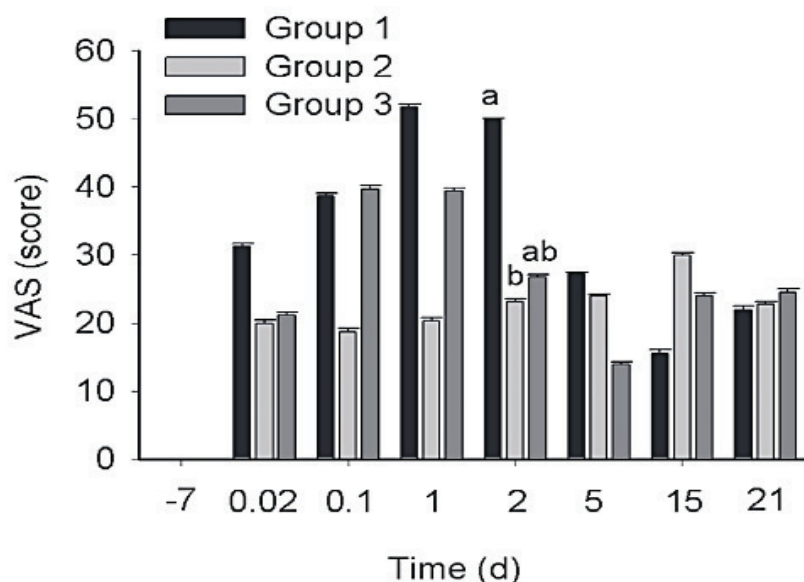
The occurrence rate of “feeding behavior” significantly increased at d 2 relative to d -7 in group 3 ( $P = 0.0006$ ; **Figure 16** panel C). At d 2, the RR of “feeding behavior” in group 2 was 5.62 (95 % CI = 2.52 to 12.59;  $P < 0.001$ ) and in group 3, 4.16 (95 % CI = 2.64 to 6.57;  $P < 0.001$ ) times higher relative to group 1 (**Figure 16** panel C).

In group 1, the occurrence rate of “head low/forward” decreased at both d 0 and d 2 relative to d -7 (both  $P < 0.001$ ; **Figure 16** panel D). Group 2 did not change over time. In group 3, the occurrence rate of “head low/forward” decreased at d 0 relative to d -7 ( $P < 0.001$ ), whereas the occurrence rate of “head low/forward” increased at d 1 ( $P < 0.001$ ), d 2 ( $P = 0.001$ ), d 5 ( $P = 0.0013$ ), and d 19 ( $P < 0.001$ ) relative to d -7. At d 2, group had 2.74 (95 % CI = 1.64 to 4.58;  $P < 0.001$ ) and 2.66 (95% CI = 1.89 to 3.74;  $P < 0.001$ ) times fewer events of “head low/forward” than groups 2 and 3, respectively (**Figure 16** panel D). At d 5, the RR in group 3 was 2.74 (95 % CI = 1.64 to 4.58;  $P < 0.001$ ) times higher relative to that in group 2 (**Figure 16**, panel D).

In group 1, the occurrence rate of “head high/turned” significantly decreased at d 0 compared with d -7 ( $P = 0.0002$ ) and decreased in group 3 at d 2 compared with d -7 ( $P < 0.001$ ; **Figure 16** panel E). At d 2, the RR in group 2 of “head high/turned” was 3.03 (95 % CI = 2.26 to 4.06;  $P < 0.001$ ) times more relative to group 3 (**Figure 16** panel E).

### 2.1.5.5 Observer-reported pain measures

Results of the GEE models are shown in **Tableau V**. For VAS, at d 2, the RR of increased VAS score in group 1 was 2.15 (95 % CI = 1.34 to 3.45;  $P = 0.0015$ ) times more relative to group 2 (**Figure 17**). We observed no significant difference between groups for the other time comparison for VAS, VPS, and TPS (data not shown).



**Figure 17. Visual analog scale (VAS) by group over time.**

Data are presented as LSM estimates and SE for groups of  $n = 3$  to 5 cows. Time points 0.02 and 0.10 correspond to d 0 at 2 h and 10 h, respectively. At each time point, different letters (a, b) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected  $\alpha$  level was 0.002. Results are LSM  $\pm$  SE. Group 1 cows ( $n = 4$ ) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows ( $n = 5$ ) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows ( $n = 3$ ) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.

Cronbach's coefficient  $\alpha$ , calculated as an exploratory analysis, was 0.67 for the VPS. The poor correlation between the VPS total score and the following physiological items: VPS-T ( $r = 0.19$ ), VPS-HR ( $r = 0.10$ ), and VPS-RR ( $r = 0.12$ ) indicated that these items were not concordant with the VPS score (see **Tableau III** for definitions). The remaining items: VPS-BP ( $r = 0.27$ ), VPS-A ( $r = 0.54$ ), VPS-WP ( $r = 0.30$ ), VPS-App ( $r = 0.60$ ), VPS-Face ( $r = 0.59$ ), and VPS-Post ( $r = 0.55$ ) had acceptable correlations with the VPS score, showing that these items were homogeneous. For the TPS, Cronbach's coefficient  $\alpha$  was 0.71 and correlations of

each item with the total score showed that the items were concordant with the total score ( $0.21 < r < 0.70$ ).

#### 2.1.5.6 Physiological and pathological measurements

The GEE models for EDA and plasma cortisol indicated significant effects for time, the interaction of group with time, and RA (all  $P < 0.001$ ; **Tableau IV**).

At d -7, EDA (unitless) did not differ between groups 1 [median (25–75 % interquartile range, IQR) = 2.2 (2.1–2.7)], 2 [2.4 (2.2–2.8)], and 3 [1.9 (1.8–1.9)]. The EDA measurements increased, on average, by 12.4 % for about 4 h in all groups and no difference was detected between groups during this time (data not shown). At d 15 only, the RR of decreased EDA in group 3 [EDA, 1.6 (1.4–1.9)] was 2.37 (95 % CI = 1.36 to 4.12;  $P = 0.002$ ) and 2.40 (95 % CI = 1.53 to 3.77;  $P < 0.001$ ) relative to group 1 [EDA, 2.3 (1.5–4.0)] and group 2 [EDA, 4.0 (2.1–4.2)].

At d -7, plasma cortisol concentrations (median and IQR) were not different between groups 1 [22.45 (14.70–31.95) nmol/L], 2 [21.90 (14.70–31.95) nmol/L], and 3 [21.80 (16.60–27.20) nmol/L]. The concentration of plasma cortisol increased, on average, by 241 % for about 4 h in all groups and no difference between groups was observed during this time (data not shown). At d 7, group 1 [31.6 (20.7–52.4) nmol/L] had 1.39 (95 % CI = 1.22 to 1.57;  $P < 0.001$ ) times higher plasma cortisol compared with group 3 [14.6 (10.0–23.8) nmol/L]. In addition, group 2 [27.7 (19.3–36.4) nmol/L] had 1.42 (95 % CI = 1.24 to 1.62;  $P < 0.001$ ) times higher plasma cortisol compared with group 3 at the same time. At d 21, the RR of increased cortisol in group 1 [40.0 (25.6–55.9) nmol/L] was 1.49 (95 % CI = 1.23 to 1.82;  $P < 0.001$ ) relative to group 2 [22.4 (18.5–22.8) nmol/L]. The RR of increased cortisol was 1.34 (95 % CI = 1.12 to 1.59;  $P = 0.0008$ ) in group 3 [30.4 (15.5–54) nmol/L] relative to group 2. Other significant differences between groups did not emerge (data not shown).

Daily observation of cattle showed a huge decrease in feed intake (as mentioned in the video analysis section with a between-groups difference) and decreased qualitative (both protein and fat) and quantitative milk production; significant signaling of inflammation (hematological analyses including circulating leucocyte and neutrophil counts, fibrinogen, and total plasma protein) was also observed (data not shown), with few statistically significant differences between groups. Autopsy confirmed local inflammation with fibrin, reticular

abscesses, and lack of reticulum perforation in all cows, to the same extent (reticular abscesses, extended inflammation, fibrin, necrosis around the foreign body and skin incision, moderate signs of peritonitis). The extent of tissue lesions was similar among cows and it was impossible to know whether lesions induced the same level of pain severity.

### **2.1.6 Discussion**

Outcome measures used in this study were used to detect negative outcomes (difference between baseline and post TRP induction; i.e., specificity to pain detection) and to predict the responsiveness to known analgesics (difference between the expected 3 levels of pain severity provided by the 3 levels of analgesia; i.e., sensitivity to analgesia). Our hypothesis was that the analgesic protocol used in group 1 (single postoperative aspirin administration) would be poor, close to a negative control, whereas the highest level of analgesia would be present in group 3, and intermediate in group 2. None of the tested methods except one (CSF TTR) consistently demonstrated predicted pain levels (pain higher in group 1 than in group 2, which was higher than in group 3). First, the highest predicted level of pain intensity (group 1) at d 2 had lower CSF TTR, decreased CSF noradrenaline, and increased mechanical hypersensitivity. Of the 3 methods cited above, CSF TTR downregulation demonstrated the best ability to predict the responsiveness to analgesics. Second, behavioral analysis in group 1 demonstrated a higher level of discomfort compared with group 3, as reflected by a trend for increased MA (d 5 and d 19), more events of “agitation while lying” (at d 2, 5, and 19), and fewer events of “feeding behavior.” In contrast, the high occurrence of “head low/forward” and decreased MA lasted throughout the period from d 1 to d 21 in group 3, suggesting that group 3 cows were less alert. Third, subjective evaluations made up of the VAS, VPS, and TPS scores, and physiological measurements (EDA and plasma cortisol measurements) did not consistently reflect expected levels of pain intensity, but for a limited number of time points of assessment denoted higher intensity of pain in group 1 with VAS, EDA, and cortisol. These findings support the need for measurement of central pain mechanisms and corresponding behavioral evaluation in the assessment of bovine pain in clinical trials. The present study also underlines the potential application of a potent pain biomarker, TTR, in assessing chronic pain.

Rescue analgesia was given to keep cows out of significant pain and distress. Use of RA could obscure the interpretation of the data, but in fact, the effects of pain itself could also

produce unwanted variability (Carbone 2011). In this study, RA did not obstruct data interpretation because we included information about RA in our statistical model to explain part of the variability of outcome data. In addition, information about RA was used as a surrogate to assess pain. First, the short time for the first required RA dose suggested that group 1 cows had more postoperative pain than cows of groups 2 and 3, whereas the latter were similar. Second, in contrast to our hypothesis, the occurrence rate of administration of RA in group 3 was intermediate between that of group 1 and group 2. It is possible that the sedative effect of the opioids used in group 3 was a confounding factor for assessing pain or that the small sample size in group 3 led to a type I error. It also should be noted that the decision to administer RA was based on live evaluation *via* observer-reported pain assessment (VAS, VPS, and TPS) as well as EDA. All of these measures have shown poor psychometric qualities in the current study, so the validity of the decision to administer RA is, *a posteriori*, doubtful. Moreover, the threshold (50 % of the total) for determining whether RA was to be administered was arbitrary because we were unaware of equivalent data in the literature.

This experimental chronic pain study showed a long-lasting decrease in CSF TTR and noradrenaline release, as well as the presence of mechanical hypersensitivity in group 1. This indicates activation of centralized pain mechanisms. In addition, the change in MPT and CSF TTR, as observed in group 1, was suppressed (almost totally) by preemptive multimodal analgesia in group 3. Taken together, these findings suggest that the activity of the descending inhibitory pain control and a concomitant increase of TTR in the dorsal horn of the spinal cord in the visceral pain state might be related to the antihyperalgesic effects of preemptive multimodal analgesia.

In this report, proteomic analysis allowed identification of TTR. This 55-kDa protein is composed of 4 identical subunits of approximately 14 kDa each, synthesized predominantly in cells of the choroid plexus and liver and secreted into the CSF or plasma, respectively (Schreiber 2002). The role of TTR is recognized mainly in the transport of thyroxin (Monaco 2000; Power, Elias et al., 2000), in neuroprotection (Santos, Lambertsen et al., 2010), and in degenerative and chronic diseases in human adults (Richardson 2007). Interestingly, TTR has been reported in pain studies as decreased in rat spinal cord after injury (Afjehi-Sadat, Brejnikow et al., 2010) and in blood following herniotomy surgery in human patients (Fricova, Vejrazka et al., 2010). Previously, TTR was identified in human serum as an inhibitor of

constitutive interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production by human endothelial cells, and also inhibited lipopolysaccharide-induced IL-1 $\beta$  production by various cell types (Borish, King et al., 1992). It is recognized IL-1 $\beta$  to play a central role in many inflammatory processes. In addition, IL-1 $\beta$  is implicated in spinal cord central sensitization (Milligan and Watkins 2009). Probably, TTR functions by inhibiting the processing of newly synthesized peptides for secretion and thus may act as an endogenous antiinflammatory mediator. It has also been demonstrated that TTR knockout mice, compared with wild-type mice, show a 2-fold increase in CSF neuropeptide Y and even more in the brain (hippocampus) and the dorsal root ganglion of the sciatic nerve (associated with a 1.5-fold increase in substance P;(Nunes, Saraiva et al., 2006). Both excitatory neuropeptides are involved in pain transmission and modulation. In the current study, TTR was able to differentiate between groups at d 21, supporting the original hypothesis. In addition, we showed that at d 1–8, TTR decreased in group 3, but increased in group 1, and, at d 21, TTR decreased in group 1. This finding supports that neuronal plasticity exists in the process of CSF TTR release caused by the pain model, where we could hypothesize that TTR counteracts the increased release of inflammatory cytokines and excitatory neurotransmitters. With time, we could propose hypothetically their sustained release to be associated with a high degree of TTR “consumption” as buffer, leading to decreased TTR expression in chronic pain.

This study also demonstrated that RA ameliorated CSF TTR levels. In line with this, a previous study showed a decrease in plasma TTR after inflammation but an increase after administration of glucocorticoids or NSAID (Ingenbleek and Young 2002; Richter, Woo et al., 1983). Thus, TTR release may reflect endogenous inhibitory control of pain in response to inflammatory and neuropathic stimulation. In addition, this TRP model decreased feeding behavior, and others have demonstrated that TTR is influenced by malnutrition and stress (Ingenbleek and Young 2002). Therefore, TTR might be an indicator of both lack of welfare and pain in dairy cattle.

The concentration of CSF noradrenaline was constant throughout the 21-d period in groups 2 and 3, whereas CSF noradrenaline was decreased in group 1 at d 15 and 21. The latter could indicate sustained activation of the descending noradrenergic inhibitory pain pathway up to d 1–8, followed by fatigue of the same pathway. This was in line with previous studies that reported decreased CSF noradrenaline release following traumatic pain in patients (Cui, Xu et al., 2012). Nevertheless, CSF noradrenaline was a moderately effective pain biomarker because



it did not differentiate between the 3 expected levels of analgesia. In addition, group 1 demonstrated large, undesirable variability in this measure. In fact, both the lack of sensitivity and the variability of CSF noradrenaline measurement may be due to the effects of various confounding factors. For example, stress (Saito, Kanazawa et al., 2002) and co-morbidity between pain and stress (Tsigos and Chrousos 2002) increase CSF noradrenaline. In the present study, we also observed stress on the basis of high plasma cortisol and EDA, suggesting that stress might affect CSF noradrenaline release. It is also possible that RA might have increased CSF noradrenaline concentrations in this study, because CSF noradrenaline release has been observed following administration of gabapentin (Hayashida, Obata et al., 2008) and NSAID (Fiebich, Candelario-Jalil et al., 2006). It appears that CSF noradrenaline is responsive in some part to chronic pain, but it suffers from the aforementioned limitations that would likely restrict its usefulness in testing analgesic drug efficacy in cattle.

Allodynia associated with mechanical sensitivity due to underlying centralized pain was assessed with MPT. Both a stress response (Herskin, Munksgaard et al., 2004) and decreased reactivity associated with stoic behavior (Rasmussen, Fogsgaard et al., 2011) were previously reported in dairy cows with mastitis and might confound the sensitization–pain relationship. For this reason, mechanical pain tests were repeated at multiple sites on each leg, and in the absence of a human experimenter, controlling for effects of variations in sensitivity of different sites on a single limb and for handling stress. A delayed and long-lasting mechanical hypersensitivity was shown in group 1, which confirmed central sensitization in cattle and validated some sensitivity of this method. We found no obvious difference in mechanical sensitivity between groups 2 and 3, suggesting that the responsiveness of this test to different pain intensities could be limited. Interestingly, a clear protective and long-lasting antihyperalgesic effect of preemptive tolfenamic acid was observed in group 2 cows at d 21, whereas in group 1 cows, RA consisting mainly of tolfenamic acid did not produce hyposensitivity at that time point. This latter finding is in accordance with previous studies in which ketoprofen use had no effect on mechanical sensitization in clinically lame cows (Laven, Lawrence et al., 2008; Whay, Waterman et al., 1998). Therefore, the finding of reduced responsiveness to an NSAID when central sensitization is already established supports this assessment method. These current findings emphasize the need for other therapeutic pain



management strategies for cattle in pathological pain states, such as centrally acting analgesic drugs (Malreddy, Coetzee et al., 2013).

The pain model affected MA, but group 1 cows were more active than cows in both analgesic groups following pain induction. This is in line with a previous study demonstrating decreased activity in meloxicam-treated cows following dehorning (Heinrich, Duffield et al., 2010), and higher MA after acute abdominal pain compared with healthy cows (Edwards and Tozer 2004). The decrease in MA was present in all 3 groups (compared with d -7) and this decrease was responsive (less marked) to preemptive analgesics at d 2 (difference between groups 2 and 3). The interference of subsequent RA made the interpretation of MA data difficult. Importantly, automated video analysis showed early (d 2) dramatic and temporary changes: Group 1 cows had more “agitation while lying,” fewer “feeding behavior” events, and fewer “head low/forward” events compared with group 3. These results provide strong evidence of discomfort in group 1 cows, as previously observed in cattle (White, Coetzee et al., 2008; Edwards and Tozer 2004). Group 1 cows showed more “agitation while lying” from d 2 to 19, which suggested progressive and long-lasting discomfort. Indeed, the best sensitivity and specificity was achieved with the behavior “agitation while lying” for both acute and chronic pain. In contrast, differences were not detected between groups for the spontaneous behavior “lying down.” Daily lying time recorded *via* accelerometer (Newby, Pearl et al., 2013) did not differentiate ketoprofen-treated cows from a placebo group. Altogether, postural change might not be sensitive to pain. “Feeding behavior” was more frequent in both preemptive analgesic groups relative to group 1 at d 2. Recently, surgical treatment of a displaced abomasum in cows treated with ketoprofen apparently improved their feeding behavior compared with that of placebo-treated cows (Newby, Pearl et al., 2013). Although feeding behavior is seemingly important in assessing pain, some limitations were shown because of the large individual variability at d 2 and the lack of specificity for pain. Moreover, because feeding behavior has been demonstrated to be altered in myriad conditions affecting cows (González, Tolkamp et al., 2008; Fogsgaard, Røntved et al., 2012; Urton, von Keyserlingk et al., 2005; Huzzey, Veira et al., 2007) this behavioral criterion is unlikely to be sensitive and specific for assessing chronic pain. In contrast to a previous study (Mialon, Deiss et al., 2012), group 1 cows had fewer “head low/forward” behaviors, whereas group 3 cows had more “head low/forward” and fewer “head high/turned” behaviors. Interpretation of the cow’s head position alone is not sufficient because

both head and ear position may indicate interest in the environment and may reflect alert behavior. In addition, sedative side effects of the drugs were suggested both by the head positions and the long-lasting decrease in MA, as previously observed in another species (Rialland, Authier et al., 2012).

In this study, for the observer-reported pain scores, the best sensitivity was demonstrated with VAS because it was the only measure that differentiated between groups at d 2. Neither the VPS nor the TPS demonstrated good psychometric (internal consistency and sensitivity) qualities. Thus, validation of the bovine pain scales (VPS and TPS) was not achieved in this study. In particular, for the VPS, scores for the physiological items were poorly correlated with the overall VPS score. Therefore, the physiological items should be discarded in a potential future version of this pain scale.

Plasma cortisol and EDA indirectly measure activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the autonomic nervous system, respectively. Neither method was able to detect different levels of acute pain. These results emphasize that acute pain can be confounded with stress, preventing clear interpretation of cortisol release with respect to pain intensity, as has been previously observed in dairy cattle following rumenocentesis (Mialon, Deiss et al., 2012) or castration (Bergamasco, Coetzee et al., 2011). In addition, these results emphasize the lack of validity of EDA as previously cited in a bovine pain study (Baldrige, Coetzee et al., 2011). Interestingly, both methods indicate some chronic stress in group 1. Nevertheless, cortisol concentration and EDA measurement obtained during chronic pain were close to the values obtained at baseline. Thus, we argue that neither cortisol nor EDA is likely to be useful for assessing analgesia during acute and chronic pain states in cattle.

One limitation of the current study is that pain symptoms may be confounded with sickness behaviors of TRP, particularly decreased feeding behavior. Because of the pilot nature of this study, interpretation of pain symptoms must be considered in light of specific environmental conditions and disease pathophysiology. Therefore, it would be judicious to repeat the assessments under other housing conditions (e.g., in freestalls) and under different physiological states of the dairy cows. The main limitation of this model was the small sample size. To keep sufficient power for analysis, both the pain biomarkers and MPT measurements were averaged during the first 8-d period. This statistical method might have decreased the sensitivity of the assessment methods used during acute pain. However, it was the only method

that permitted comparisons between pain biomarker levels and MPT tests, which was important in regard to the exploratory nature of studying these 2 promising pain assessment methods. The discovery of a specific and sensitive proteomic biomarker will require confirmation in other species and other pain models before innovative methods to track the neuroproteomic changes can be developed.

### **2.1.7 Conclusion**

The visceral pain model activated spinal pain pathways and induced pain-related behaviors. Preemptive multimodal analgesia had a long-lasting effect, decreasing both central sensitization and pain-related behaviors, allowing us to test our hypothesis of different responsiveness (sensitivity) of methods to quantify pain. Measurements that may be affected by nonspecific stress should be analyzed with caution in pain studies. Interestingly, measurement of CSF TTR appears to have the potential to improve the sensitivity of detection of response to analgesic therapy in dairy cows suffering from chronic pain.

### **2.1.8 Acknowledgements**

The authors thank the Natural Science and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (#327158-2008), the Canada Foundation for Innovation Ongoing New Opportunities Fund Grant (#9483), and Vetoquinol S.A. (France) for their fellowships supporting the present work. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Éric Laflamme, Valerie Morin, Normand Lacasse, Guy Beauchamp, and Yaseid El Said (FMV, Université de Montréal, QC, Canada). A kind thought is addressed in memoriam to Jacques de Champlain and his laboratory team (Institut de recherches cliniques de Montréal and Department of Physiology, Université de Montréal, QC, Canada) for their support in all conducted bio-analyses.

### **2.1.9 References**

Afjehi-Sadat L, Brejnikow M, Kang SU, et al. (2010) Differential protein levels and post-translational modifications in spinal cord injury of the rat. *Journal of Proteome Research* 9: 1591-1597.

- Baldrige SL, Coetzee JF, Dritz SS, et al. (2011) Pharmacokinetics and physiologic effects of intramuscularly administered xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride-butorphanol tartrate alone or in combination with orally administered sodium salicylate on biomarkers of pain in Holstein calves following castration and dehorning. *American Journal of Veterinary Research* 72: 1305-17.
- Bergamasco L, Coetzee JF, Gehring R, et al. (2011) Effect of intravenous sodium salicylate administration prior to castration on plasma cortisol and electroencephalography parameters in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 34: 565-76.
- Borish L, King MS, Mascali JJ, et al. (1992) Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation* 16: 471-84.
- Carbone L (2011) Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives. *PLoS One* 6: e21578.
- Chambers JP, Waterman AE and Livingston A (1994) Further development of equipment to measure nociceptive thresholds in large animals. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 21: 66-72.
- Cui Y, Xu J, Dai R, et al. (2012) The interface between inhibition of descending noradrenergic pain control pathways and negative affects in post-traumatic pain patients. *Upsala Journal of Medical Sciences* 117: 293-99.
- de Champlain J, Karas M, Assouline L, et al. (2007) Effects of Valsartan or Amlodipine Alone or in Combination on Plasma Catecholamine Levels at Rest and During Standing in Hypertensive Patients. *The Journal of Clinical Hypertension* 9: 168-78.
- Edwards JL and Tozer PR (2004) Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders. *Journal of Dairy Science* 87: 524-31.
- Fiebich BL, Candelario-Jalil E, Mantovani M, et al. (2006) Modulation of catecholamine release from rat striatal slices by the fixed combination of aspirin, paracetamol and caffeine. *Pharmacological Research* 53: 391-96.
- Fogsgaard KK, Røntved CM, Sørensen P, et al. (2012) Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science* 95: 630-38.
- Fricova J, Vejrazka M, Stopka P, et al. (2010) The influence of pre-emptive analgesia on postoperative analgesia and its objective evaluation. *Arch Med Sci.* 6: 764-71.

- González LA, Tolkamp BJ, Coffey MP, et al. (2008) Changes in feeding behavior as possible indicators for the automatic monitoring of health disorders in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91: 1017-28.
- Hayashida K-i, Obata H, Nakajima K, et al. (2008) Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology* 109: 1077-84.
- Heinrich A, Duffield TF, Lissemore KD, et al. (2010) The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cauterization with a local anesthetic. *Journal of Dairy Science* 93: 2450-57.
- Herskin MS, Munksgaard L and Ladewig J (2004) Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiology & Behavior* 83: 411-20.
- Huxley JN and Whay HR (2006) Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *The Veterinary Record* 159: 662-8.
- Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, et al. (2007) Parturition behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science* 90: 3220-33.
- Ingenbleek Y and Young VR (2002) Significance of transthyretin in protein metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40: 1281-91.
- Jahn H, Wittke S, Zürlig P, et al. (2011) Peptide fingerprinting of Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid: Identification and prospective evaluation of new synaptic biomarkers. *PLoS One* 6: e26540.
- Kemp MH, Nolan AM, Cripps PJ, et al. (2008) Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. *Veterinary Record* 163: 175-9.
- Krohn CC (1994) Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. 3. Grooming, exploration and abnormal-behavior. *Applied Animal Behaviour Science* 42: 73-86.
- Krohn CC and Munksgaard L (1993) Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. 2. Lying and lying-down behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 37: 1-16.
- Kunz S, Tegeder I, Coste O, et al. (2005) Comparative proteomic analysis of the rat spinal cord in inflammatory and neuropathic pain models. *Neuroscience Letters* 381: 289-93.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Laven RA, Huxley JN, Whay HR, et al. (2009) Results of a survey of attitudes of dairy veterinarians in New Zealand regarding painful procedures and conditions in cattle. *New Zealand Veterinary Journal* 57: 215-20.
- Laven RA, Lawrence KE, Weston JF, et al. (2008) Assessment of the duration of the pain response associated with lameness in dairy cows, and the influence of treatment. *New Zealand Veterinary Journal* 56: 210-7.
- Malreddy PR, Coetzee JF, KuKanich B, et al. (2013) Pharmacokinetics and milk secretion of gabapentin and meloxicam co-administered orally in Holstein-Friesian cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 36: 14-20.
- Mialon MM, Deiss V, Andanson S, et al. (2012) An assessment of the impact of rumenocentesis on pain and stress in cattle and the effect of local anaesthesia. *The Veterinary Journal* 194: 55-59.
- Milligan ED and Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10: 23-36.
- Molony V, Kent JE and Robertson IS (1995) Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. *Applied Animal Behaviour Science* 46: 33-48.
- Monaco HL (2000) The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482: 65-72.
- Müller R and Schrader L (2003) A new method to measure behavioural activity levels in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* 83: 247-58.
- Müller R and Schrader L (2005) Individual consistency of dairy cows' activity in their home pen. *Journal of Dairy Science* 88: 171-75.
- Newby NC, Pearl DL, LeBlanc SJ, et al. (2013) The effect of administering ketoprofen on the physiology and behavior of dairy cows following surgery to correct a left displaced abomasum. *Journal of Dairy Science* 96: 1511-20.
- Nunes AF, Saraiva MJ and Sousa MM (2006) Transthyretin knockouts are a new mouse model for increased neuropeptide Y. *The FASEB Journal* 20: 166-68.
- Pan W (2001) Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics* 57: 120-25.

- Power DM, Elias NP, Richardson SJ, et al. (2000) Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *General and Comparative Endocrinology* 119: 241-55.
- Rasmussen D, Fogsgaard K, Rontved C, et al. (2011) Changes in thermal nociceptive responses in dairy cows following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53: 32.
- Remie R and Zaagsma J (1986) A new technique for the study of vascular presynaptic receptors in freely moving rats. *Am J Physiol* 251: H463-7.
- Rialland P, Authier S, Guillot M, et al. (2012) Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: a prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. *PLoS One* 7: e49480.
- Richardson SJ. 2007. 'Cell and Molecular Biology of Transthyretin and Thyroid Hormones.' in W. Jeon Kwang (ed.), *International Review of Cytology* (Academic Press).
- Richter MB, Woo P, Panayi GS, et al. (1983) The effects of intravenous pulse methylprednisolone on immunological and inflammatory processes in ankylosing spondylitis. *Clinical and Experimental Immunology* 53: 51-59.
- Saito K, Kanazawa M and Fukudo S (2002) Colorectal distention induces hippocampal noradrenaline release in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 947: 146-9.
- Santos SD, Lambertsen KL, Clausen BH, et al. (2010) CSF transthyretin neuroprotection in a mouse model of brain ischemia. *Journal of Neurochemistry* 115: 1434-44.
- Schreiber G (2002) The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40: 1200-10.
- Stafford KJ and Mellor DJ (2005) Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *The Veterinary Journal* 169: 337-49.
- Steen H and Mann M (2004) The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 699-711.
- Stilwell G, Carvalho RC, Carolino N, et al. (2010) Effect of hot-iron disbudding on behaviour and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. *Research in Veterinary Science* 88: 188-93.
- Strohalm M, Hassman M, Košata B, et al. (2008) mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 905-08.



- Theurer ME, White BJ, Coetzee JF, et al. (2012) Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. *BMC Vet Res* 8.
- Tsigos C and Chrousos GP (2002) Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53: 865-71.
- Urton G, von Keyserlingk MAG and Weary DM (2005) Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science* 88: 2843-49.
- Walker KA, Duffield TF and Weary DM (2011) Identifying and preventing pain during and after surgery in farm animals. *Applied Animal Behaviour Science* 135: 259-65.
- Whay HR, Waterman AE, Webster AJ, et al. (1998) The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 156: 23-9.
- White BJ, Coetzee JF, Renter DG, et al. (2008) Evaluation of two-dimensional accelerometers to monitor behavior of beef calves after castration. *American Journal of Veterinary Research* 69: 1005-12.
- Ziegler A, Kastner C and Blettner M (1998) The generalised estimating equations: an annotated bibliography. *Biometrical Journal* 40: 115-39.



## **2.2 Association between sensitisation and pain-related behaviours in an experimental canine model of osteoarthritis**

Cet article, publié dans *Pain*, a permis de valider la présence ainsi qu'à la quantification du biomarqueur de la TTR identifiée préalablement dans le modèle de douleur viscérale bovine, mais sur un modèle de douleur arthrosique canine suite à une induction chirurgicale. Le but de cet article était d'évaluer la façon dont la douleur centralisée se produit et la façon dont elle est liée aux symptômes de la douleur arthrosique chez des chiens par comparaison entre des animaux traités avec un structuromodulateur et ceux traités avec le véhicule.

Des différences dans les niveaux de douleur ont été détectées et quantifiées et plusieurs outils d'évaluation de types comportementales, neurophysiologiques et physiologiques de la douleur chronique ont été validés (spécificité et fiabilité) par la Dre Pascale Rialland lors de ses études au doctorat. La quantification neuroprotéomique (neuropeptides spinaux) quant à leur association ou non avec le développement du phénomène de la sensibilisation a été accomplie par Mme Colombe Otis. Les résultats de cet article soutiennent clairement un rôle majeur de la douleur liée à la sensibilisation centrale se produisant dans ce modèle canin d'arthrose. La quantification spinale de la TTR et de la SP sont des outils prometteurs afin d'évaluer et d'identifier ces changements et sensibles également aux traitements pharmacologiques.

Mme Colombe Otis a participé aux analyses neuroprotéomiques à partir d'homogénat d'une section de moelle épinière de chien pour la TTR, soit à l'élaboration, au développement et à l'exécution des méthodologies permettant son identification sur gel électrophorèse puis son extraction, sa digestion tryptique et finalement, son identification avec le Dr Francis Beaudry. Ensuite, elle a également procédé à la purification puis à la quantification de la TTR dans cet homogénat par immunodosage et finalement, à l'analyse et aux traitements des données. Pour la SP, Mme Otis a exécuté l'homogénat de moelle épinière puis l'identification ainsi que la quantification ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr Francis Beaudry. Pour la rédaction du manuscrit, elle a assisté la Dre Rialland dans les analyses statistiques et elle a participé activement à la recherche littéraire, l'infographie ainsi qu'à la rédaction des sections concernant la portion d'analyse neuroprotéomique.

## *Pain*

2014 (155): 2071-2079

Pascale Rialland<sup>1,2</sup>, Colombe Otis<sup>1,2</sup>, Maxim Moreau<sup>1,2</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>2</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>2</sup>, Francis Beaudry<sup>1,2</sup>, Jérôme RE del Castillo<sup>1,2</sup>, Thierry Bertaim<sup>3</sup>, Dominique Gauvin<sup>1,2</sup>, Eric Troncy<sup>1,2</sup>

### **2.2.1 Abstract**

Evaluation of nociceptive sensitisation in canine osteoarthritis studies has been poorly reported, or even related to other clinical symptoms. In 16 dogs, peak vertical force (PVF), subjective pain assessment using 3 scales, sympathetic stress response with electrodermal activity (EDA) measurement, and behavioural changes with video analysis and telemetered motor activity were quantified at baseline (D-7), and 28 and 56 days post transection of the cranial cruciate ligament. As markers of central sensitisation, selected spinal cord biomarkers (substance P and transthyretin) were quantified at D56. Electrical withdrawal thresholds on the stifle and the tail were measured as indicative of peripheral and central quantitative sensory testing (QST) sensitisation, respectively. The effects of vehicle administration (n = 8) were compared with tiludronate (2 mg/kg subcutaneously, q2week, starting at D0) administration. Generalized estimated equations tested the association between the behavioural and physiological methods and QST sensitisation, and therefore the sensitivity of the methods for detecting treatment efficacy. Compared to tiludronate, at D56, vehicle-treated dogs had increased spinal substance P ( $P = 0.01$ ), concomitant decreased transthyretin ( $P = 0.02$ ), and (compared to baseline) demonstrated peripheral and central QST sensitisation, which was not present for tiludronate. Only PVF, the spontaneous behaviour “walking with full weight-

---

<sup>1</sup>Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec (GREPAQ), Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 7C6, Canada

<sup>2</sup>Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM), Montreal, QC H2L 4M1, Canada

<sup>3</sup>R&D Exploratory Clinics, CEVA Santé Animale, Libourne 33500, France

bearing,” and EDA were associated with occurrence of QST sensitisation and indicated significant tiludronate analgesic efficacy after inclusion of central QST sensitisation as a predictor variable in the statistical model. This study establishes the strong interest to implement QST as a predictor of canine osteoarthritis pain symptoms explained by pain sensitisation.

### **2.2.2 Keywords**

Dog surgical model of osteoarthritis, Spinal biomarkers, Electrical quantitative sensory testing, Peripheral and central sensitisation, Physiological and behavioural outcome measures, Bisphosphonate, Tiludronate

### **2.2.3 Introduction**

Developmental arthropathies and joint trauma predispose dogs to the structural changes of osteoarthritis (OA), which, as in humans, leads to crippling pain and disability (Martinez 1997; Martinez and Coronado 1997). Animal experiments have produced a wealth of information on pain, but this knowledge has failed to yield new analgesics for use in humans (Dolgin 2010; Quessy 2010).

Biomechanical, histological, and macroscopic structural (Proffen, McElfresh et al., 2012), genomic, and molecular (Lorenz, Wenz et al., 2005) similarities were reported between human posttraumatic OA (Little and Hunter 2013) and the dog surgical cranial cruciate ligament transection (CCLT) model of OA, as well as a structure–function (pain) relationship translated from the dog CCLT model to the human OA pain condition: Similar to reports in human OA patients (Torres, Dunlop et al., 2006; Yusuf, Kortekaas et al., 2011; Zhang, Nevitt et al., 2011), pain in CCLT-dog model, indirectly assessed by kinetics, evolved with bone marrow lesions modulation, as well as progression of osteophyte, effusion/synovitis, and meniscal insults (Moreau, Pelletier et al., 2013). At variance with the preclinical rodent models, the dog CCLT model of OA offers an available translational predictability in therapy response with regard to the natural OA disease both in dogs (Moreau, Pelletier et al., 2013) and in humans (Mogil 2009). For example, structural and functional benefits of disease-modifying strategies have been translated with strontium ranelate from the dog CCLT model (Pelletier, Kapoor et al., 2013) to the human OA patient (Reginster, Badurski et al., 2013). This was also the case

for doxycycline, local hyaluronan, bisphosphonates, diacerhein, licofelone, and other nonsteroidal antiinflammatory drugs (for references, see (Moreau, Pelletier et al., 2013)).

Evaluation of nociceptive sensitisation in canine OA has been poorly reported, and has not been related to other clinical symptoms (Lascelles 2013). Most information on quantitative sensory testing (QST) is based on rodent models and published data on humans. Recently, QST studies performed on naturally occurring OA in cats (Guillot, Moreau et al., 2013) and dogs (Brydges, Argyle et al., 2012; Moore, Hettlich et al., 2013) yielded the first evaluation of central processing changes in companion animals. Interestingly, whereas most of the OA cats responded favourably to meloxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, those classified as allodynic on the basis of QST did not (Guillot, Moreau et al., 2013). Moreover, in an experimental visceral pain model in cows, central sensitisation assessed with mechanical QST was associated with behavioural responses and changes in spinal pain proteomics (Rialland, Otis et al., 2014).

Interestingly, tiludronate, a bisphosphonate known to inhibit bone resorption, demonstrated a decrease in structural changes (Pelletier, Troncy et al., 2011) and antiinflammatory activity in the canine CCLT pain model (Moreau, Rialland et al., 2011). Altogether, preventive administration of tiludronate might influence centralised pain concurrently to OA symptoms in the CCLT model.

The study aimed to evaluate how centralised pain occurs and is related to OA pain symptoms by comparison between tiludronate- and vehicle-treated CCLT dogs. The first objective evaluated centralised pain as assessed by the changes in spinal pain proteomics as well as in electrical QST, while comparing both groups. Our second objective investigated the relationship between the behavioural (gait analysis, visual analogue scale [VAS], the Standardized Technician Arthritis Pain Scale [STAPS], the Standardized Veterinarian Arthritis Pain Scale [SVAPS], and video analysis) and physiological (electrodermal activity [EDA] and motor activity) outcome measures related to OA pain symptoms with the centralised pain factor outcomes (spinal neuropeptides, peripheral and central QST measurements). If an association was observed, the third objective was to assess a modelisation of tiludronate treatment effect, including, or not, a centralised pain factor, for the concerned behavioural and physiological methods.

## 2.2.4 Materials and methods

### 2.2.4.1 Dogs and experimental desing

The experiments were performed according to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved (RECH-1268) by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal.

Sixteen adult crossbred dogs (aged 2 to 3.5 years), 26 (3.4) kg, originating from an external source (Laka [1994], St-Basile-le-Grand, QC, Canada) and housed in ArthroLab Inc. (St-Basile-le-Grand, QC, Canada) facilities, were used for the study. Before inclusion, health status evaluation included clinical examination, haematological and serum biochemical analyses, and radiography. The dogs were housed individually in a controlled room environment. Food was given once daily and removed overnight. Tap water (purified by filtration) was available to the animals ad libitum. The dogs were freely exercised in groups of 2 to 3 for 2hours every weekday. During a 3-week period of acclimatization, the dogs were trained to trot over the floor mat-based plantar force measurement system.

In this randomized, double-blind, placebo-controlled study with a parallel design, the pain assessment was done at day (D)-7 (baseline), before being repeated at D28 and D56, while a standardized CCLT surgery was performed at D0 in dogs under general anaesthesia (Boileau, Martel-Pelletier et al., 2010; Moreau, Rialland et al., 2011). Observer #1 performed live assessments in the following sequential order: VAS-1, STAPS, and EDA. Observer #2 performed both live assessments (VAS-2 and SVAPS) and the video capture and analysis of the spontaneous behaviours. Both observers were unaware of the timeframe of the study and blinded to the treatment group where dogs were assigned.

Dogs were randomly divided into 2 treatment groups using a block randomization approach. Each group was equally divided with respect to sex and body weight of dogs. One group ( $n = 8$  dogs) received 2 mg/kg disodium tiludronic acid dissolved in a mannitol solution (CEVA Santé Animale, Libourne, France). The negative control ( $n = 8$ ) received only the mannitol solution (CEVA Santé Animale). Treatments (0.2 mL/kg) were administered subcutaneously at D0, D14, D28, and D42. At the end of the experiment (D56), all the dogs were euthanized with an overdose of intravenous (i.v.) sodium pentobarbital (Euthanyl,

Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada). The spinal cord of each dog was immediately collected, frozen (-60°C, methanol:hexane 50:50 on dry ice), and stored at -80°C pending analysis.

#### **2.2.4.2 Anaesthesia and CCLT surgery**

Preoperative analgesia was comprised of transdermal fentanyl (50 or 75 µg/h, Duragesic; Janssen Ortho, Markham, ON, Canada) applied 12 hours prior to surgery. Intramuscular meperidine (5 mg/kg Meperidine HCl 10 %, Baxter Healthcare Corporation, Toronto, ON, Canada), acepromazine maleate (0.05 mg/kg, Atravet 1 %, Boehringer-Ingelheim, Burlington, ON, Canada), and glycopyrrolate (0.01 mg/kg Robinul 0.2 mg/mL, Baxter Healthcare Corporation, Toronto, ON, Canada) were administered as premedication. Anaesthesia was induced with i.v. propofol (6 mg/kg, Propoflo 1 %, Abbott Animal Health, North Chicago, IL, USA) and was maintained with isoflurane (Aerrane, Baxter Healthcare Corporation, Mississauga, ON, Canada) *via* a coaxial circuit with oxygen flow set at 20-200 mL/kg/min and isoflurane vaporizer set at 2-3 %. Surgery was performed on the right hind limb. The surgical method was previously described (Boileau, Martel-Pelletier et al., 2010). Briefly, a medial stifle arthrotomy was performed, distal to the patella and parallel to the patellar ligament to allow visual CCLT. Intraarticular bupivacaine (5-8 mL, Marcaïne 0.5 %, Hospira, St-Laurent, QC, Canada) was injected as sutures of the capsule and the retinaculum were completed.

#### **2.2.4.3 Centralised pain evaluation**

##### *2.2.4.3.1 Selected spinal cord neuropeptides*

Each frozen spinal cord section from the lumbar area (L3 to L7 section) was weighed and homogenized using a Tissue-Tearor following the addition of phosphate-buffered saline solution 0.01M at a ratio of 1:5 (v/v) and protease inhibitor cocktail (n° P8340, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at the same ratio. The samples were sonicated for 20 minutes and 150 µL of the homogenate was mixed with 150 µL of acetonitrile to remove larger proteins. The samples were then vortexed and centrifuged at 12,000 g for 10 minutes. The supernatant (150 µL) was transferred into an injection vial, and then spiked with 150 µL of the internal standard solution. Vials were capped and vortexed at high speed prior to analysis. Selected spinal cord

peptides, substance P (SP), and transthyretin (TTR), were identified based on full-scan tandem mass spectrometry (MS/MS) spectra, and quantification was performed in selected reaction monitoring, and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

Acetic anhydride 99.5 % and ammonium bicarbonate were obtained from Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Substance P was purchased from Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA, USA). Acetonitrile was purchased from Thermo Fisher Scientific (Bridgewater, NJ, USA) and trifluoroacetic acid, formic acid, and ammonium hydroxide 28.0-30.0 % were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Standard solutions were prepared as previously described (Pailleux, Vachon et al., 2013).

The high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) system included a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump, and a Thermo Advantage Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Data were acquired and analysed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA), and regression analyses were performed with PRISM (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness-of-fit. The calibration curves were constructed from the peak-area ratios of SP and corresponding analogue acetylated SP used as internal standard. The reaction was performed as previously described (Che and Fricker 2002) and the bioanalytical selected reaction-monitoring method as previously published (Pailleux, Vachon et al., 2013).

The TTR peptide identification was performed as previously described (Rialland, Otis et al., 2014) by HPLC-MS/MS following sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis separation and tryptic digestion. Spinal cord homogenates were filtrated using Amicon Ultra 50K filters (Millipore, Bioscience, MA, USA). Quantitative analysis of canine TTR was performed in filtrate using an enzyme-linked immunosorbent assay (Cusabio Biotech Co., Ltd, Newark, DE, USA) kit.

#### 2.2.4.3.2 *Electrical QST sensitisation*

As originally the therapeutic target of tiludronate was not expected to be antiinflammatory, but bone remodelling, a mechanical QST, looked less appropriate than an electrical QST to demonstrate a treatment effect on central sensitisation. Moreover, we expected the electrical stimulation to embrace all types (ie, A[beta], A[delta], and C) as well as



peptidergic (or not) nerve fibres at the level of the periosteum, as they have been recognised as playing an important role in controlling bone-associated nociception (Gronblad, Liesi et al., 1984).

Electrical QST threshold was quantified following a ramped cutaneous electrical stimulus applied to the dogs at 2 different sites to test, respectively, peripheral and central sensitisation. Bipolar stimulation electrodes (stainless steel, joined together by an isolated piece of plastic) were placed on the shaved skin at a mapped point around the scar of the stifle (QST-stifle) and on a marked point of the tail (QST-tail). Ramped stimulation currents were delivered by a continuous current stimulus isolation unit controlled by a stimulator (Grass Stimulator S8CR, Grass Instruments Company, Quincy, MA, USA). Stimuli (duration of 1second, frequency of 1Hz) were started from a baseline current at 8volts, with increases by 2volts. A cut-off value was set at 40volts. An observer indicated painful electrical current thresholds at the time when a clear behavioural change in the dogs was observed, thus terminating the stimulation. One reading was collected for each site. Skin was checked afterwards for detection of any injury secondary to the electrical stimulus.

#### **2.2.4.4 Behavioural data outcomes (gait analysis, VAS, STAPS, SVAPS, and video analysis)**

##### *2.2.4.4.1 Gait analysis*

In dogs, the use of a floor mat-based plantar force measurement system acquires limb loading and is defined as a quantitative measurement of gait function. For the right (CCL-deficient) hind limb, peak vertical force (PVF) was acquired while the dogs applied the limb on the Walkway System (Tekscan, Inc., Boston, MA, USA) at a trotting velocity ranging from 1.9 to 2.2 meters/second. Velocity and acceleration ( $\pm 0.5$  meter per second<sup>2</sup>) were ensured using a set of 3 photoelectric cells specially designed for this podobarometric device (LACIME; École de Technologie Supérieure, Montréal, QC, Canada). The gait acquisition window was 3 seconds, with a sampling rate set at 44 hertz, producing a total of 132 frames. Raw PVF (kg) data from the first 5 valid trials were obtained for each dog and later used for statistical purposes using body weight (BW) as a covariate (Boileau, Martel-Pelletier et al., 2010). Data were



expressed as percentage of BW (% BW), as previously described (Moreau, Rialland et al., 2011).

#### *2.2.4.5.2 Other behavioural data outcomes (VAS, STAPS, SVAPS, and video analysis)*

The lameness and pain of treated and control OA dogs were evaluated additionally using previously developed scoring systems comprised of a continuous VAS of 100 mm range between the “no pain” and the “severest pain” boundaries (Quinn, Keuler et al., 2007), and 2 composite numerical rating scales (STAPS and SVAPS; Appendices 1 and 2), which were completed by, respectively, a technician and a veterinarian observer.

The video capture of behavioural changes in terms of body position and motor activities allows a noninvasive monitoring of pain-related functional disability and discomfort. Recording was performed at baseline and at week 8 only in the outdoor runs where the dogs were allowed to exercise. As previously described (Rialland, Authier et al., 2012), the observer blinded to group assignment quantified the 4 following spontaneous behavioural items: “Stand full, head down” (dog was standing with full weight bearing of the operated stifle, while it had its head down), “Stand full, look around” (dog was standing with full weight bearing of the operated stifle, while it was looking around), “Walk full” (dog was walking with full weight bearing of the operated stifle), and “Trot full” (dog was trotting with full weight bearing of the operated stifle). The videos were watched in a randomized order. For each video, the items were quantified by means of a computer-compatible time coding (The Observer XT, Noldus Information Technology, Tracksys Ltd., Nottingham, UK). The occurrence rate of each item recorded during the 2-hour period was used for further analysis.

#### **2.2.4.5 Physiological data outcomes (EDA, motor activity)**

##### *2.2.4.5.1 EDA*

Changes in skin conductance response (EDA) resulting from sympathetic neuronal activity (Storm 2008) has recently been validated in the canine CCLT model of OA as a measurement of stress or pain that is strongly associated with functional outcomes (Moreau, Rialland et al., 2011). The Pain Gauge (PHIS, Inc., Dublin, OH, USA) device was applied to the right palmar paw (dry and nonclipped) of the dogs until the reading was recorded.

Measurements ranged between 0.1 (the lowest pain and stress) and 9.9 (the highest pain and stress). Three readings were collected and averaged for thorough analysis.

#### *2.2.4.5.2 Motor activity*

Dog motor activity was recorded *via* an electronic chip placed on a neck collar (Actical; Bio-Lynx Scientific Equipment, Inc., Montreal, QC, Canada). Monitoring was performed during 24 hours with an epoch length of 2 minutes. The intensity of motor activity (no unit) was recorded for each count. The 24-hour period was divided into the 2 following periods: a daylight period from 6:00am to 5:58pm, and a night period for the remaining time. Exploratory analysis of the data showed that the intensities of motor activity during the night period were of zero value for every dog. Therefore, only motor activity recorded during the daytime period was used. We used the median value of the intensities of motor activity recorded during the daylight period. Motor activity recording was reliable and has been validated for monitoring pain-related functional disability in canine OA (Brown, Boston et al., 2010; Rialland, Bichot et al., 2013).

### **2.2.4.6 Statistical analysis**

#### *2.2.4.6.1 Treatment effect in centralised pain (spinal pain neuropeptides and electrical QST sensitisation)*

##### *2.2.4.6.1.1 Spinal cord neuropeptides*

Welch's t-test with exact probabilities was conducted to compare (2-sided) the spinal concentrations of SP and TTR between the 2 treatment conditions (vehicle and tiludronate) at D56.

##### *2.2.4.6.1.2 Electrical QST sensitisation*

The generalized estimation equation (GEE) for repeated measures was applied to QST-stifle and QST-tail (Agresti 2002). The data distribution followed a Poisson distribution. Exchangeable correlation structure was used to account for repeated observations from data on the same dog over time. The independent variables were the treatment condition, time, and interaction between time and treatment condition. The examination of model-data agreement and quality of distributional assumptions were performed in a full residual analysis.

#### *2.2.4.6.2 Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes*

The inclusion of variables (spinal neuropeptides, QST-stifle, QST-tail) as an additional factor of dependent variable (PVF, pain scores, video analysis, EDA, and motor activity) aimed to evaluate the relationship between variables.

Regardless of distribution of the data and details on aspects surrounding the model-fitting processes, the general approach aimed at addressing each dependent variable as a function of the fixed effects of time, treatment, time-per-treatment interaction, and factor following a stepwise process, without and with inclusion of each significant factor. Thorough residual analyses were performed to check all distributional assumptions and to verify model adequacy. Models were performed using all pain outcomes (gait analysis, VAS-1, VAS-2, STAPS, SVAPS, and video analysis, EDA, and motor activity).

##### *2.2.4.6.2.1 Pain scales*

We first verified the reliability of the pain scales. Interobserver reliability was tested in calculating intraclass coefficient [ICC (A,1)] between the VAS-1 and VAS-2 by use of a 2-way fixed-effects model for the repeated-measures analysis of variance. Spearman rank-correlation tests ([rho]) provided intraobserver reliability for the technician and veterinarian observers: respectively, VAS-1 score was correlated with the STAPS item #1 score, and VAS-2 score was correlated with the SVAPS item #1 score at both D28 and D56, such as the intraobserver reliability was performed only when dogs felt pain. The nonparametric correlation was chosen because it fit the best to the distribution of the data, and it was calculated using a paired data set where each “pair” was 2 different measurements made for a single unit. Cronbach [alpha] was calculated to estimate the internal consistency of both STAPS and SVAPS. In this study, data reliability was considered acceptable when ICC was higher than 0.80, [rho] higher than 0.70, and Cronbach [alpha] higher than 0.70 (Streiner and Norman 2002).

Repeated-measures generalized linear models with GEE were used for VAS, STAPS, and SVAPS where data were assumed to distribute under the over-dispersed Poisson probability functions. The variance scale factor was estimated by Pearson's  $[\chi]^2/\text{degree of freedom}$ . Best working matrix was determined to be first-order autoregressive following the strategy proposed by Littell et al. (Littell, Pendergast et al., 2000).

#### 2.2.4.6.2.2 Gait analysis, EDA, and motor activity

A linear mixed-model approach for repeated measures (Littell, Pendergast et al., 2000) was applied to PVF, EDA, and motor activity intensity. We analysed the data using the restricted maximum likelihood as a method of estimation, with a compound symmetry within-subject covariance matrix for fixed and random effects, and the denominator degrees of freedom were estimated by the Kenward-Roger method. Intercept and trials (for PVF and EDA) were included as random effects. A logarithm transformation was applied to improve model fit. Baseline data were used as covariate for motor activity because groups were significantly different at D-7. We applied a compound symmetry covariance structure, based on goodness-of-fit criteria (Akaike information criterion and Bayesian information criterion).

#### 2.2.4.6.2.3 Video-automated behavioural analysis

The occurrence of each specific event was cumulated. Frequencies were then compared between groups using a negative binomial regression model with baseline occurrence as covariate. Values were expressed as changes in the frequency of a given behaviour according to the tested group.

#### 2.2.4.6.3 *Sensitivity of the behavioural and physiological outcomes to detect a treatment effect over time including, or not including, a centralised pain evaluation as factor*

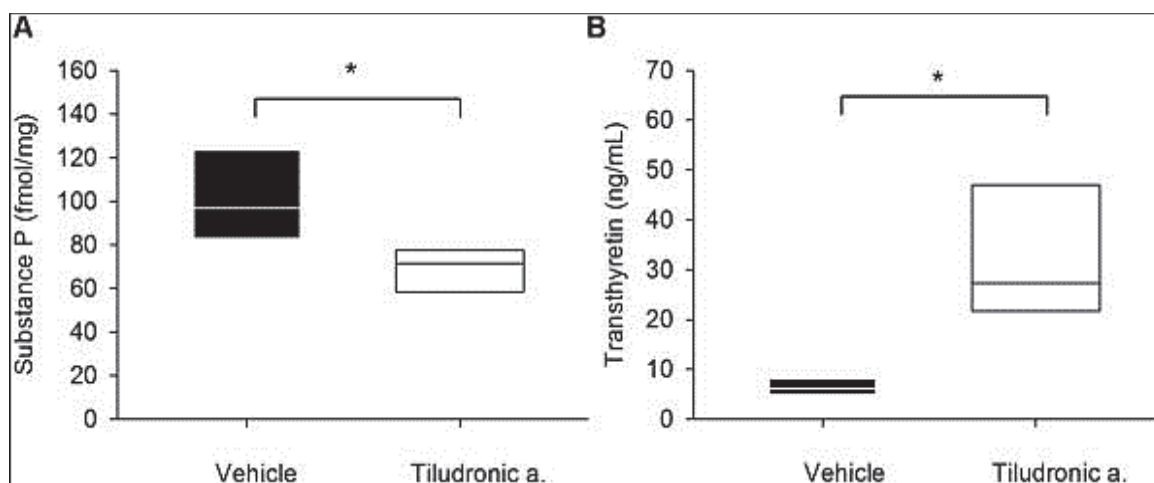
Finally, if an association between the behavioural or physiological outcomes was significant with a centralised pain factor variable, we then evaluated the treatment effect while integrating (or not) the centralised pain factor variable in the statistical model. For these models, the least squares means and differences of estimated least squares means (DLSM)  $\pm$  SE are presented.

Statistical analyses were carried out using SAS software (version 9.2, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). The [alpha] level of significance was set at 2-sided 5 %. Bonferroni correction for multiple comparisons was applied when necessary. The adjusted  $P$ -values ( $P_{adj}$ ) are multiplied by the number of multiple comparisons (7 comparisons for both QST-tail and QST-stifle alone, 2 comparisons for PFV, and EDA when factors are included).

## 2.2.5 Results

### 2.2.5.1 Spinal cord neuropeptides

At D56, the tiludronate-treated dogs had different spinal cord concentrations of SP (**Figure 18** panel A) and TTR (**Figure 18** panel B) than those in the vehicle-treated dogs, both differences showing statistical significance ( $P = 0.01$ , and  $P = 0.02$ , respectively).



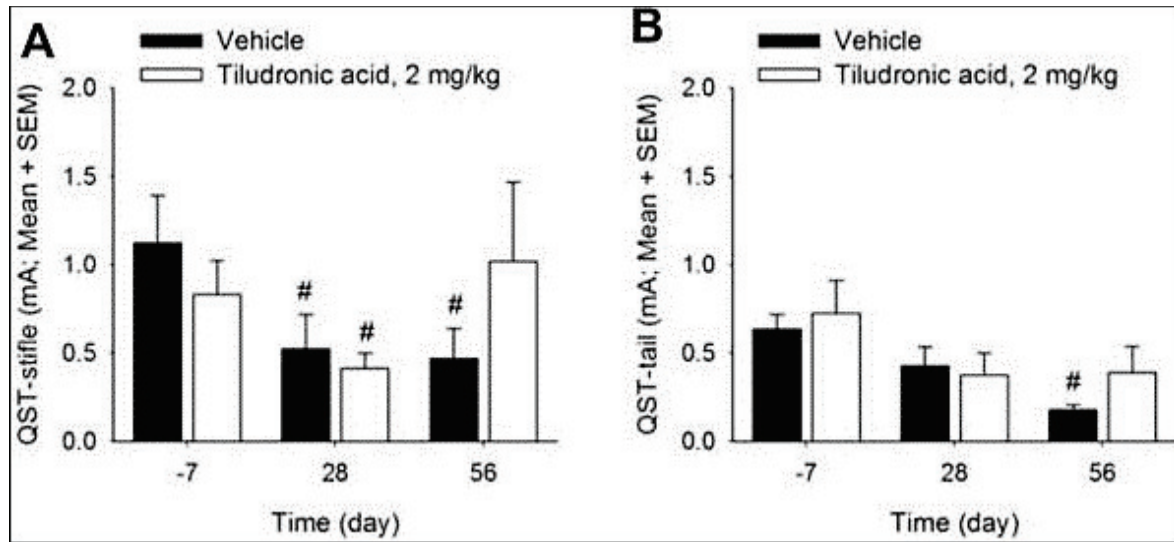
**Figure 18. Spinal cord concentrations of Substance P and transthyretin.**

Effects of vehicle and tiludronic acid on the concentration of (panel A) substance P and (panel B) transthyretin in the spinal cord. The results are presented in box plots with medians and interquartile ranges. A star indicates significantly different values between treatment conditions with 2-sided Welch's t-test at D56,  $P < 0.05$ .

### 2.2.5.2 Electrical QST sensitisation

The analysis of QST-stifle revealed that for the vehicle-treated dogs, it decreased progressively from D-7 to D56, but the tiludronate-treated dogs only had decreased values at D28 (**Figure 19** panel A). These differences resulted in statistically significant effects for time ( $P = 0.001$ ) and time  $\times$  treatment interaction ( $P = 0.03$ ), but not for treatment ( $P = 0.78$ ).

The analysis of QST-tail also revealed significant effects for time ( $P < 0.0001$ ) and time $\times$ treatment interaction ( $P = 0.05$ ), but not for treatment ( $P = 0.39$ ). **Figure 19** panel B reveals a shallower decrease pattern for QST-tail in the vehicle-treated dogs compared to QST-stifle, but significance was reached at D56 compared to both D-7 (DLSM =  $-1.37 \pm 0.13$ ,  $P < 0.0001$ ) and D28 (DLSM =  $-0.87 \pm 0.26$ ,  $P = 0.0008$ ). In contrast, the QST-tail variation recorded in the tiludronate-treated dogs did not reach statistical significance.



**Figure 19. Electrical quantitative sensory testing.**

Effects of vehicle and tiludronic acid (2 mg/kg subcutaneously, q2week, starting at D0) on the electrical quantitative sensory testing (QST) when stimulus was applied on (A) the stifle (QST-stifle)<sup>a</sup>; and (B) the tail (QST-tail)<sup>b</sup>. The results are expressed as the mean + SEM. # indicates significantly different QST values over time for the same treatment condition,  $P_{\text{adj}} < 0.05$ . <sup>a</sup> Wald statistics for type 3 generalized estimation equation (GEE) analysis for time ( $[\text{chi}]^2 = 13.1, P = 0.001$ ), time  $\times$  treatment interaction ( $[\text{chi}]^2 = 6.4, P = 0.03$ ), and treatment ( $[\text{chi}]^2 = 0.1, P = 0.78$ ). <sup>b</sup> Wald statistics for type 3 GEE analysis for time ( $[\text{chi}]^2 = 1.89, P < 0.0001$ ), time  $\times$  treatment interaction ( $[\text{chi}]^2 = 5.9, P = 0.05$ ), and treatment ( $[\text{chi}]^2 = 1.8, P = 0.19$ ).

### 2.2.5.3 Relationship between factors and both the behavioural and physiological evaluations

#### 2.2.5.3.1 Reliability of the pain scales

The VAS reached a high reliability, both between (ICC [A,1] = 0.92) and within ( $[\text{rho}] > = 0.86$  at D28, and  $[\text{rho}] > = 0.72$  at D56;  $P < 0.001$  in all cases) observers. The internal consistency was acceptable for SVAPS (Cronbach  $[\alpha] = 0.85$ ), but low for STAPS (Cronbach  $[\alpha] = 0.55$ ). Therefore, only SVAPS was retained for further analyses to investigate its association with the factors.

#### 2.2.5.3.2 Relationship between the factor QST-stifle and both the behavioural and physiological evaluations

The multivariate GEE regression analysis indicated that both PVF (Slope [95% confidence]=0.019 [0.007-0.030],  $P = 0.001$ ) and “Walk full” (0.15 [0.01-0.28],  $P = 0.03$ ) increased with QST-stifle. Motor activity decreased with increasing QST-stifle (-0.62 [-1.24 to

-0.01],  $P = 0.05$ ). From these 3 outcomes, only the GEE regression analysis of “Walk full” yielded a significant time×treatment interaction ( $P = 0.01$ ), not PVF or motor activity. There was no significant relationship between VAS-1, VAS-2, SVAPS, EDA, “Stand full, head down,” “Stand full, look around,” or “Trot full” and QST-stifle.

#### *2.2.5.3.3 Relationship between the factor QST-tail and both the behavioural and physiological evaluations*

The multivariate GEE regression analysis indicated that PVF increased with QST-tail (0.011 [0.001-0.022],  $P = 0.03$ ). The following outcomes were all negatively associated with QST-tail: VAS-1 (-0.29 [-0.48 to -0.10],  $P = 0.002$ ), VAS-2 (-0.25 [-0.43 to -0.07],  $P = 0.006$ ), SVAPS (-0.19 [-0.27 to -0.10],  $P < 0.0001$ ), EDA (-0.09 [-0.18 to -0.01],  $P = 0.02$ ), “Walk full” (-0.05 [-0.09 to -0.02],  $P = 0.002$ ), and motor activity (-1.09 [-1.85 to -0.33],  $P = 0.005$ ). The GEE models also yielded a significant time×treatment interaction for PVF ( $P = 0.05$ ), VAS-1 ( $P = 0.03$ ), EDA ( $P = 0.001$ ), and “Walk full” ( $P = 0.004$ ). There was no relationship between QST-tail and “Stand full, head down,” “Stand full, look around,” or “Trot full” measurements.

#### *2.2.5.3.4 Relationship between the spinal cord biomarkers and both the behavioural and physiological evaluations*

Only SP was positively associated with EDA (0.014 [0.01-0.028],  $P = 0.05$ ) and VAS-2 (0.01 [0.001-0.020],  $P = 0.05$ ). No other significant relationship was observed.

#### **2.2.5.4 Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect**

In the statistical model that excludes the factors (**Tableau VI**), only PVF and the video-analysis behaviours demonstrated a significant treatment effect of tiludronate in comparison to the vehicle-placebo at D56. No treatment difference was observed at D28.



**Tableau VI. Treatment effect without including the predictors.**

Measures <sup>a</sup>		Treatment	Time	Time × treatment	Group difference Differences in time × treatment least squares means ± SEM <sup>b</sup>
<b>PVF</b>	F	3.56	<b>686.35</b>	<b>4.72</b>	Tiludronate > placebo at D56 0.59 ± 0.24 <i>P</i> <sub>adj</sub> = 0.03
	<i>P</i>	0.08	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.01</b>	
VAS 1	F	1.30	2.85	1.77	
	<i>P</i>	0.26	0.09	0.18	
VAS 2	F	3.69	13.56	0.60	
	<i>P</i>	0.05	<b>0.0002</b>	0.44	
SVAPS	F	3.77	0.01	0.14	
	<i>P</i>	0.05	0.99	0.70	
<b>Stand full, head down</b>	$\chi^2$	0.95	35.15	3.68	Tiludronate > placebo at D56 1.07 ± 0.49 <i>P</i> <sub>adj</sub> = 0.03
	<i>P</i>	0.33	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.05</b>	
<b>Stand full, look around</b>	$\chi^2$	0.31	18.04	0.68	
	<i>P</i>	0.58	<b>&lt;0.0001</b>	0.41	
<b>Walk full</b>	$\chi^2$	3.47	81.46	7.88	Tiludronate > placebo at D56 1.65 ± 0.53 <i>P</i> <sub>adj</sub> = 0.002
	<i>P</i>	0.06	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.005</b>	
<b>Trot full</b>	$\chi^2$	3.08	96.37	7.43	Tiludronate > placebo at D56 1.84 ± 0.58 <i>P</i> <sub>adj</sub> = 0.002
	<i>P</i>	0.08	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.006</b>	
EDA	F	0.99	2.16	3.03	
	<i>P</i>	0.38	0.15	0.06	
Motor activity <sup>c</sup>	F	0.26	14.74	2.36	
	<i>P</i>	0.60	0.066	0.30	

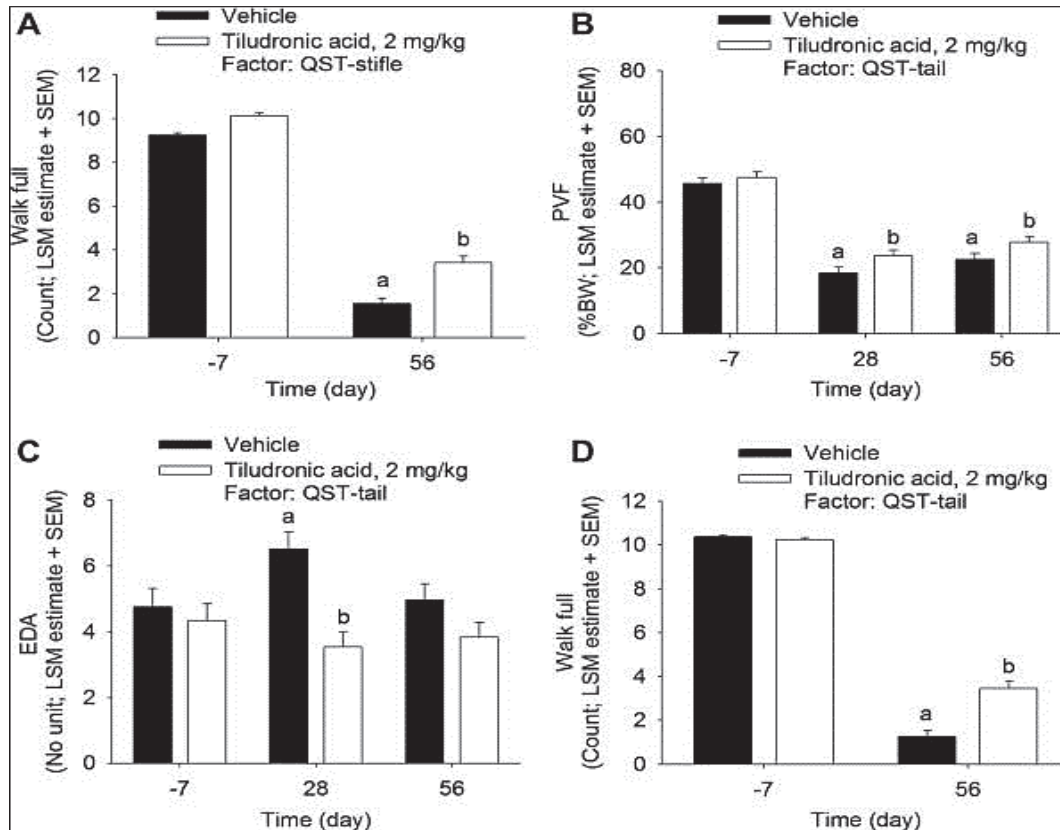
<sup>a</sup>Measures were the following: peak vertical force (PVF); visual analogue scale of Observer 1 (VAS-1); visual analogue scale of Observer 2 (VAS-2); Standardized Veterinarian Arthritis Pain Scale (SVAPS); Electrodermal activity (EDA); the 4 spontaneous behaviours: “Walk full” (dog was walking with full weight bearing of the operated limb), “Stand full, head down” (dog was standing with full weight bearing of the operated limb while dog had its head down), “Stand full, look around” (dog was standing with full weight bearing of the operated limb while dog was looking around), and “Trot full” (dog was trotting with full weight bearing of the operated limb); and Motor activity. Data present the results of the tests (F or the  $\chi^2$  tests), and the *P*-value (*P*) of the type 3 fixed effects for time, treatment condition, and the interaction between time and treatment condition (time treatment). Boldface highlights the significant type 3 fixed effects.

<sup>b</sup>SEM, and the adjusted *P*-value (*P*<sub>adj</sub>) of the post hoc analysis.

<sup>c</sup>Values recorded at D-7 were used as covariates in the model. Significant group differences are presented by the differences in time treatment least squares means.

The results of the mixed model with QST-stifle as factor showed that only “Walk full” differed between groups. At D56, its DLSP estimates were higher in the tiludronate-treated dogs than in the vehicle-treated dogs (DLSP = 0.79 ± 0.39, *P*<sub>adj</sub> = 0.04) (**Figure 20** panel A).





**Figure 20. Histogram of the least squares means (LSM) estimates  $\pm$  SEM derived from generalized linear analyses.**

(A) “Walk full” when quantitative sensory testing applied on the stifle (QST-stifle) was a factor<sup>a</sup>; (B) Peak vertical force (PVF) when QST applied on the tail (QST-tail) was factor<sup>b</sup>; (C) Electrodermal activity when QST-tail was a factor<sup>c</sup>; (D) “Walk full” when QST-tail was a factor<sup>d</sup>. Different letters indicate significantly different values between vehicle-treated dogs and tiludronate-treated dogs (tiludronic acid, 2 mg/kg subcutaneously, q2week, starting at D0),  $P_{\text{adj}} < 0.05$ . <sup>a</sup> Type 3 tests of fixed effects for time (F value = 93.3,  $P < 0.0001$ ), time  $\times$  treatment interaction (F value = 6.0,  $P = 0.01$ ), and treatment (F value = 2.8,  $P = 0.09$ ). At D56, DLSM estimates were higher in the tiludronate-treated dogs than in the vehicle-treated dogs (DLSM =  $0.79 \pm 0.39$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.04$ ). <sup>b</sup> Type 3 tests of fixed effects for time (F value = 515.3,  $P < 0.0001$ ), time  $\times$  treatment interaction (F value = 3.0,  $P = 0.04$ ), and treatment (F value = 3.1,  $P = 0.05$ ). The DLSM estimates of PVF were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs, both at D28 ( $0.06 \pm 0.02$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.04$ ) and D56 ( $0.06 \pm 0.02$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.04$ ). <sup>c</sup> Type 3 tests of fixed effects for time (F value = 5.1,  $P = 0.07$ ), time  $\times$  treatment interaction (F value = 19.9,  $P < 0.0001$ ), and treatment (F value = 6.7,  $P = 0.009$ ). At D28, DLSM estimates were lower for tiludronate- than for vehicle-treated dogs ( $-2.98 \pm 0.70$ ,  $P_{\text{adj}} < 0.001$ ). <sup>d</sup> Type 3 tests of fixed effects for time (F value = 88.3,  $P < 0.0001$ ), time  $\times$  treatment interaction (F value = 8.4,  $P = 0.004$ ), and treatment (F value = 3.3,  $P = 0.04$ ). At D56, DLSM estimates of “Walk full” were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs ( $1.01 \pm 0.44$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.02$ ).

The results of the mixed model with QST-tail as factor showed that PVF, EDA, and “Walk full” differed between groups. There was no significant difference between treatment conditions for VAS-1, VAS-2, SVAPS, and motor activity ( $P_{\text{adj}} > 0.06$ ) (data not shown).

However, when QST-tail was introduced in the model, the DLSP estimates of PVF were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs (**Figure 20** panel B), both at D28 ( $0.06 \pm 0.02$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.04$ ) and D56 ( $0.06 \pm 0.02$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.04$ ). For EDA at D28 (**Figure 20** panel C), the DLSP estimates were lower for tiludronate- than for vehicle-treated dogs ( $-2.98 \pm 0.70$ ,  $P_{\text{adj}} < 0.001$ ). At D56 (**Figure 20** panel D), the DLSP estimates of “Walk full” were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs ( $1.01 \pm 0.44$ ,  $P_{\text{adj}} = 0.02$ ).

### 2.2.6 Discussion

The goal of this project was to assess centralised pain and the relationships between pain sensitisation and evaluation of OA symptoms in tiludronate- and vehicle-treated CCLT dogs. The novel findings of this study were that preventive and repeated administration of tiludronate reduced pronociceptive SP and concurrently increased TTR release at the spinal cord level when compared to placebo. There was no statistically significant difference between groups to support a treatment effect, but in contrast to vehicle-treated dogs, the tiludronate-treated dogs presented no peripheral (measured with QST-stifle) or central (measured with QST-tail) sensitisation 56 days post-CCLT when compared to D-7. First, these results support the development of peripheral and central sensitisation in the CCLT dog model at D28 and 56, after altered biomechanical stability and inflammation occurred. The pain sensitisation reported herein corroborates the reported findings in surgically induced OA in dogs (Brydges, Argyle et al., 2012) and rats (Bove, Laemont et al., 2006), as well as in naturally occurring OA in cats (Guillot, Moreau et al., 2013). Secondly, although bisphosphonates have not been reported to provide central analgesic activity, preventive tiludronate modulated onset of pain sensitisation and the release of spinal neuropeptides such as SP and TTR. The bone remodelling and bone loss are active components of the OA disease process (Burr and Gallant 2012), the antiresorptive activity of tiludronate might have contributed to decreasing the severity of posttraumatic OA process at an early stage in this CCLT model (Moreau, Rialland et al., 2011).

We demonstrated a strong relationship between behavioural and physiological data outcomes with the centralised pain factor outcomes, provided by measurement of spinal neuropeptides and peripheral and central QST sensitisation. This suggests that this research, encompassing statistical modalities, permitted the identification of validated surrogates for pain assessment in an OA dog model that are related to pain sensitisation. In addition, these statistical

models will not necessarily produce different results compared with simpler methods. However, they tend to yield more accurate results, thereby increasing the likelihood that the findings might be replicable in future studies, or successfully translated to other species.

### **2.2.6.1 Sensitisation**

As previously described in arthritic rats (Ferland, Pailleux et al., 2011; Ivanavicius, Ball et al., 2007), the concentration of spinal SP, a pain biomarker, increased at 56 days post CCLT. Increased spinal SP partly supports more central sensitisation caused by the CCLT surgery in vehicle-treated dogs than in tiludronate-treated dogs. Higher SP was concomitant with a lower concentration of TTR at the spinal level in the vehicle-treated dogs when compared to tiludronate-treated dogs. Interestingly, concentration of TTR decreased in human patients suffering from rheumatoid arthritis (Li, Zheng et al., 2010), whereas cerebrospinal fluid (CSF) TTR downregulation (compared to baseline values) demonstrated an ability to predict the responsiveness to analgesics in a visceral experimental pain model in cows (Rialland, Otis et al., 2014). In the latter, large-volume CSF sampling allowed for a high-throughput screening of pain proteome. For all pain outcome measures tested in this experiment, the CSF TTR demonstrated the highest specificity and sensitivity (Rialland, Otis et al., 2014). It is thus conceivable that the inflammatory OA pain decreased the spinal concentration of TTR, a decrease modulated by the antiinflammatory activity of tiludronate.

Tiludronate-treated dogs presented some peripheral sensitisation at D28, but no more at D56. A partial but sustained antihyperalgesic effect of tiludronate was also demonstrated in the model of complete Freund adjuvant monoarthritis in rats (Bertaim, Chapuy et al., 2013). Interestingly, meloxicam tested in this model was not very efficient against peripheral sensitisation (Bertaim, Chapuy et al., 2013), a result similar to this observed in OA cats (Guillot, Moreau et al., 2013). Vehicle-, but not tiludronate-treated dogs presented a significant central sensitisation with measurement of QST-tail at D56 post CCLT. Tiludronate had too significant an effect at D56 on the release of spinal neuropeptides (lower SP, and higher TTR) compared to the vehicle group.

It is possible that a peripheral neuronal firing at 28 days post CCLT in tiludronate-treated dogs might be responsible for the peripheral sensitisation observed at this time point. This neuronal firing was not subsequently transduced in a central sensitisation. This is supported by

the electrophysiological studies demonstrating that the neuronal excitability in OA rodent models was caused by both activation of knee joint-afferent fibres and increased dorsal horn neuronal activity (Im, Kim et al., 2010; Rahman, Bauer et al., 2009; Sagar, Staniaszek et al., 2010; Schuelert and McDougall 2009). Zoledronate, another bisphosphonate, reduced histological joint degradation in an monosodium iodoacetate rodent model (Strassle, Mark et al., 2010; Yu, Yu et al., 2012), and its inhibition of subchondral bone lesions alleviated both joint pain and central nociceptive activation (Laslett, Dore et al., 2012; Yu, Yu et al., 2012). Tiludronate administration at an early stage of the experimental OA process would support a delayed effect of bisphosphonate on occurring central pain at 56 days post CCLT, when compared to placebo.

Even if mechanical-pressure QST seems a more physiologically relevant noxious stimulus method in inflammatory joint models and is responsive to antiinflammatory drugs (Suokas, Walsh et al., 2012), we opted for a broader electrical QST, as the degree of central sensitisation was poorly described in this experimental OA model and with the hypothesis that electrical QST would be more adapted to demonstrate a potential treatment effect of tiludronate to this outcome.

#### **2.2.6.2 Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes**

Behavioural change is a realistic measure of pain because it is a desired endpoint for assessing pain. If STAPS demonstrated a relative lack of reliability, the other reliable pain scales (VAS-1, VAS-2, and SVAPS) were positively associated with central sensitisation, and VAS-2 was correlated with the release of SP at D56. These results showed that dogs with decreased QST-tail presented higher pain scores and suggest concurrent validation for these different outcomes. Nevertheless, these above measures did not demonstrate a treatment effect. The result emphasizes that subjective VAS or numerical rating scales were not accurate, confirming the failure already observed in pain studies in OA dogs (Hielm-Bjorkman, Kapatkin et al., 2011; Riialand, Bichot et al., 2013; Waxman, Robinson et al., 2008).

In the present study, the methods PVF, “Walk full,” and motor activity were associated with both peripheral and central sensitisation. These results corroborated the unwillingness to move the surgically induced OA limb (Brandt, Braunstein et al., 1991; Moreau, Riialand et al.,

2011) and the increased sensitisation after CCLT surgery (Brydges, Argyle et al., 2012) in dogs. Nevertheless, the interpretation of these relationships was not straightforward. First, PVF was positively associated with QST-stifle and QST-tail. This demonstrated that an increased centralised pain sensation (translated into low QST thresholds) was leading to a diminished weight bearing of the operated limb, and the contrary was true, a result previously observed with OA induced in rodents (Bove, Laemont et al., 2006; Fernihough, Gentry et al., 2004; Pomonis, Boulet et al., 2005). Likely, “Walk full” was positively associated with QST-stifle. Unexpectedly, “Walk full” was positively associated with the central sensitisation. Similarly, the motor activity recorded by accelerometry was positively associated with both peripheral and central sensitisation. In naturally occurring OA in dogs (Brown, Boston et al., 2010; Rialland, Bichot et al., 2013) and cats (Guillot, Moreau et al., 2013), continuous monitoring of daily motor activity revealed the usefulness of increased intensity (Guillot, Moreau et al., 2013; Rialland, Bichot et al., 2013) or daily duration (Moreau, Pelletier et al., 2013; Moreau, Rialland et al., 2011) to detect a treatment effect. Difference in data acquisition might explain the observed difference between PVF and both “Walk full” and motor activity in the present study. Recording of PVF is dictated by a standardised velocity during locomotion. Thus, PVF might translate joint ability and musculoskeletal adaptation to a limb injury during a forced walk cycle (Boettger, Weber et al., 2009; Moreau, Rialland et al., 2011; Trumble, Billingham et al., 2005). In contrast, “Walk full” and motor activity were spontaneous behaviours, recorded in dogs with freedom of movement, and may describe how the dogs with OA desired to walk and manifest restlessness.

Finally, EDA was reliable on central sensitisation only, and spinal SP in our study. A positive correlation between an increased skin conductance response following acute noxious stimulation and central pain activation was observed in human patients (Dube, Duquette et al., 2009), particularly at the limbic system of the brain (Dube, Duquette et al., 2009; Rouwette, Vanelderren et al., 2012) that is implicated in the stress response to pain. Therefore, these results argue that EDA measurement is linked to central pain.

### **2.2.6.3 Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect**

Using QST-stifle and QST-tail as factors highlighted a clear association between different behavioural and physiological methods and sensitisation over time, whereas the responsiveness to treatment allowed the detection of PVF, EDA, and “Walk full” to be related to central pain and differentiate both treatment groups. In a context of concurrent methods validation, these results support the use of PVF (Moreau, Pelletier et al., 2013) and “Walk full” behaviour (Edamura, King et al., 2012) in assessing OA canine pain symptoms. For EDA, more investigation should be performed, as EDA was not responsive to analgesia in animal pain models (Baldrige, Coetzee et al., 2011; Richardson, Niel et al., 2007), or was partially responsive (Rialland, Otis et al., 2014).

Keeping in mind that the CCLT canine model is a dynamic model (Pond and Nuki 1973), levels of inflammation and articular lesions were different from D28 to D56. In this study, only the results of the group comparison allow us to hypothesize an effect of treatment on joint inflammation without taking into account the dynamic process of OA in this model.

Our findings clearly support a major role of a centralised pain occurring in the CCLT dog model. If the spinal neuropeptides SP and TTR look promising, the levels of neuropeptides should be addressed after several months of permanent instability induced in the knee joint, thus conducting to degenerative cartilage and secondary synovitis associated to OA (Brandt, Myers et al., 1991). Further study in larger populations with a variety of validated outcome measures would warrant the inclusion of mechanistic factor(s), such as peripheral and central sensitisation, as it looks encouraging to optimise the responsiveness to treatment and its translational potential to other species and/or painful conditions.

### **2.2.7 Conflict of interest statement**

None of the authors with the exception of Dr Thierry Bertaim have competing interests. Dr Thierry Bertaim is a regular employee of CEVA; he provided the experimental therapeutic agent, participated in the study design, data analysis, and manuscript editing.

## 2.2.8 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the wonderful technical support provided by the personnel of ArthroLab, Inc., namely Mrs Carolle Sylvestre and Pascale St-Onge.

Dr Pascale Rialland received a doctoral Industrial Innovation Scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC #406726), the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT #144812) and ArthroLab, Inc. Maxim Moreau is the recipient of a Doctoral Scholarship from the Canadian Institutes of Health Research – MENTOR Strategic Training Initiative in Health Research Program. This study was supported in part by a grant from CEVA Santé Animale, Libourne, France (Thierry Bertaim), by a grant of the Osteoarthritis Chair of the University of Montreal Hospital Centre, Université de Montréal, QC, Canada; an ongoing New Opportunities Fund (#9483) and a Leader Opportunity Fund (#24601) grants from the Canada Foundation for Innovation (Eric Troncy) for the pain/function equipment; Discovery grants (#327158-2008 and #441651-2013) from the NSERC (Eric Troncy) as operating fund for pain analyses. The funding sources, except CEVA Santé Animale, were not involved in the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, nor in the decision to submit the manuscript for publication.

## 2.2.9 References

- Agresti A (2002) Categorical data analysis. Wiley-Interscience, New York.
- Baldrige SL, Coetzee JF, Dritz SS, et al. (2011) Pharmacokinetics and physiologic effects of intramuscularly administered xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride-butorphanol tartrate alone or in combination with orally administered sodium salicylate on biomarkers of pain in Holstein calves following castration and dehorning. *Am J Vet Res* 72: 1305-17.
- Boettger MK, Weber K, Schmidt M, et al. (2009) Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis. *Pain* 145: 142-50.
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, et al. (2010) Oral treatment with a *Brachytemma calycinum* D don plant extract reduces disease symptoms and the development of cartilage lesions in experimental dog osteoarthritis: inhibition of protease-activated receptor 2. *Ann Rheum Dis* 69: 1179-84.



- Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, et al. (2006) Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1041-8.
- Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, et al. (1991) Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol* 18: 436-46.
- Brandt KD, Myers SL, Burr D, et al. (1991) Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum* 34: 1560-70.
- Brown DC, Boston RC and Farrar JT (2010) Use of an activity monitor to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 237: 66-70.
- Brydges NM, Argyle DJ, Mosley JR, et al. (2012) Clinical assessments of increased sensory sensitivity in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Vet J* 193: 545-50.
- Burr DB and Gallant MA (2012) Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8: 665-73.
- Che FY and Fricker LD (2002) Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Anal Chem* 74: 3190-8.
- Dolgin E (2010) Animalgesic effects. *Nat Med* 16: 1237-40.
- Dube AA, Duquette M, Roy M, et al. (2009) Brain activity associated with the electrodermal reactivity to acute heat pain. *Neuroimage* 45: 169-80.
- Edamura K, King JN, Seewald W, et al. (2012) Comparison of oral robenacoxib and carprofen for the treatment of osteoarthritis in dogs: a randomized clinical trial. *J Vet Med Sci* 74: 1121-31.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, et al. (2011) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45: 423-9.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. (2004) Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112: 83-93.
- Gronblad M, Liesi P, Korkala O, et al. (1984) Innervation of human bone periosteum by peptidergic nerves. *Anat Rec* 209: 297-9.



- Guillot M, Moreau M, Heit M, et al. (2013) Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet J* 196: 360-7.
- Hjelm-Bjorkman AK, Kapatkin AS and Rita HJ (2011) Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dogs. *Am J Vet Res* 72: 601-7.
- Im HJ, Kim JS, Li X, et al. (2010) Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* 62: 2995-3005.
- Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, et al. (2007) Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128: 272-82.
- Lascelles BD (2013) Getting a sense of sensations. *Vet J* 197: 115-7.
- Laslett LL, Dore DA, Quinn SJ, et al. (2012) Zoledronic acid reduces knee pain and bone marrow lesions over 1 year: a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 71: 1322-8.
- Li TW, Zheng BR, Huang ZX, et al. (2010) Screening disease-associated proteins from sera of patients with rheumatoid arthritis: a comparative proteomic study. *Chin Med J (Engl)* 123: 537-43.
- Littell RC, Pendergast J and Natarajan R (2000) Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat Med* 19: 1793-819.
- Little CB and Hunter DJ (2013) Post-traumatic osteoarthritis: from mouse models to clinical trials. *Nat Rev Rheumatol* 9: 485-97.
- Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, et al. (2005) Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 7: R156-65.
- Martinez SA (1997) Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27: 735-58.
- Martinez SA and Coronado GS (1997) Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27: 759-75.
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10: 283-94.

- Moore SA, Hettlich BF and Waln A (2013) The use of an electronic von Frey device for evaluation of sensory threshold in neurologically normal dogs and those with acute spinal cord injury. *Vet J* 197: 216-9.
- Moreau M, Pelletier JP, Lussier B, et al. (2013) A Posteriori Comparison of Natural and Surgical Destabilization Models of Canine Osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013: 180453.
- Moreau M, Rialland P, Pelletier JP, et al. (2011) Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 13: R98.
- Pailleux F, Vachon P, Lemoine J, et al. (2013) Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides* 47: 261-71.
- Pelletier JP, Kapoor M, Fahmi H, et al. (2013) Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1beta in the synovium. *Ann Rheum Dis* 72: 250-7.
- Pelletier JP, Troncy E, Bertaim T, et al. (2011) Treatment with tiludronic acid helps reduce the development of experimental osteoarthritis lesions in dogs with anterior cruciate ligament transection followed by reconstructive surgery: a 1-year study with quantitative magnetic resonance imaging. *J Rheumatol* 38: 118-28.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114: 339-46.
- Pond MJ and Nuki G (1973) Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-8.
- Proffen BL, McElfresh M, Fleming BC, et al. (2012) A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *Knee* 19: 493-9.
- Quessy SN (2010) The challenges of translational research for analgesics: the state of knowledge needs upgrading and some uncomfortable deficiencies remain to be urgently addressed. *J Pain* 11: 698-700.
- Quinn MM, Keuler NS, Lu Y, et al. (2007) Evaluation of agreement between numerical rating scales, visual analogue scoring scales, and force plate gait analysis in dogs. *Vet Surg* 36: 360-7.

- Rahman W, Bauer CS, Bannister K, et al. (2009) Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 5: 45.
- Reginster JY, Badurski J, Bellamy N, et al. (2013) Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 72: 179-86.
- Rialland P, Authier S, Guillot M, et al. (2012) Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: a prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. *PLoS One* 7: e49480.
- Rialland P, Bichot S, Lussier B, et al. (2013) Effect of a diet enriched with green-lipped mussel on pain behavior and functioning in dogs with clinical osteoarthritis. *Can J Vet Res* 77: 66-74.
- Rialland P, Otis C, de Courval ML, et al. (2014) Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospective, blinded, randomized, and controlled study focusing on spinal pain proteomics. *J Dairy Sci* 97: 2118-34.
- Richardson CA, Niel L, Leach MC, et al. (2007) Evaluation of the efficacy of a novel electronic pain assessment device, the Pain Gauge, for measuring postoperative pain in rats. *Lab Anim* 41: 46-54.
- Rouwette T, Vanelderden P, de Reus M, et al. (2012) Experimental neuropathy increases limbic forebrain CRF. *Eur J Pain* 16: 61-71.
- Sagar DR, Staniaszek LE, Okine BN, et al. (2010) Tonic modulation of spinal hyperexcitability by the endocannabinoid receptor system in a rat model of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheum* 62: 3666-76.
- Schuelert N and McDougall JJ (2009) Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett* 465: 184-8.
- Storm H (2008) Changes in skin conductance as a tool to monitor nociceptive stimulation and pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 21: 796-804.
- Strassle BW, Mark L, Leventhal L, et al. (2010) Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1319-28.

- Suokas AK, Walsh DA, McWilliams DF, et al. (2012) Quantitative sensory testing in painful osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1075-85.
- Torres L, Dunlop DD, Peterfy C, et al. (2006) The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1033-40.
- Trumble TN, Billingham RC, Bendele AM, et al. (2005) Evaluation of changes in vertical ground reaction forces as indicators of meniscal damage after transection of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am J Vet Res* 66: 156-63.
- Waxman AS, Robinson DA, Evans RB, et al. (2008) Relationship between objective and subjective assessment of limb function in normal dogs with an experimentally induced lameness. *Vet Surg* 37: 241-6.
- Yu DG, Yu B, Mao YQ, et al. (2012) Efficacy of zoledronic acid in treatment of teoarthritis is dependent on the disease progression stage in rat medial meniscal tear model. *Acta Pharmacol Sin* 33: 924-34.
- Yusuf E, Kortekaas MC, Watt I, et al. (2011) Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis* 70: 60-7.
- Zhang Y, Nevitt M, Niu J, et al. (2011) Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 63: 691-9.

## **2.3 Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model**

Cet article, publié dans *Arthritis Research & Therapy*, a permis de caractériser le modèle rongeur d'induction chimique articulaire de l'arthrose et les méthodes de mesure de la douleur. Le but de cet article était d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la mesure de la douleur et l'influence de l'environnement et de l'acclimatation sur différents outils d'évaluation de la douleur chez des rats normaux puis de tester la validité simultanée des méthodes les plus fiables par rapport à l'expression de différents neuropeptides spinaux.

Les résultats de cette étude suggèrent que les méthodes d'évaluation de la douleur utilisant le modèle MIA doivent être sélectionnées et planifiées de manière appropriée. De plus, l'augmentation des concentrations des neuropeptides spinaux supportent la sensibilisation centrale observée dans ce modèle. Les présents résultats soulignent le potentiel de ces neuromédiateurs en tant que biomarqueurs pharmacologiques potentielles important pour détecter les différents niveaux d'analgésies en association avec des méthodes d'évaluation fonctionnelles sensibles.

Mme Colombe Otis a participé à la conception du schéma expérimental, aux manipulations des rongeurs, à la validation des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur et neuroprotéomique, à l'acquisition et aux traitements des données puis elle a assisté Dr Guillot pour les analyses statistiques de ces dernières. Pour la rédaction de cet article, Mme Otis était premier co-auteur avec Dre Gervais, dont cet article faisait partie aussi de ses travaux de recherches de son mémoire, mais les deux étudiantes ont participé de façon égale à cette étude. Mme Otis a participé activement à sa rédaction, à la recherche littéraire, à l'infographie de toutes les figures et tableaux de l'ensemble du manuscrit. Elle a également modifié et enrichi l'article suite aux commentaires par les réviseurs afin que ce manuscrit soit bonifié et accepté pour publication.

Colombe Otis<sup>1,2¶</sup>, Julie Gervais<sup>1¶</sup>, Martin Guillot<sup>1,2</sup>, Julie-Anne Gervais<sup>1</sup>, Dominique Gauvin<sup>1,2</sup>, Catherine Péthel<sup>1,3</sup>, Simon Authier<sup>4</sup>, Marc-André Dansereau<sup>3</sup>, Philippe Sarret<sup>3</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>2</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>2</sup>, Francis Beaudry<sup>1,2</sup>, Eric Troncy<sup>1,2</sup>

### **2.3.1 Abstract**

Lack of validity in osteoarthritis pain models and assessment methods is suspected. Our goal was to 1) assess the repeatability and reproducibility of measurement and the influence of environment, and acclimatization, to different pain assessment outcomes in normal rats, and 2) test the concurrent validity of the most reliable methods in relation to the expression of different spinal neuropeptides in a chemical model of osteoarthritic pain. Repeatability and inter-rater reliability of reflexive nociceptive mechanical thresholds, spontaneous static weight-bearing, treadmill, rotarod and operant place escape/avoidance paradigm (PEAP) were assessed by calculating intraclass correlation coefficient (ICC). The most reliable acclimatization protocol was determined by comparing coefficients of variation. In a pilot comparative study, the sensitivity and responsiveness to treatment of the most reliable methods were tested in the monosodium acetate (MIA) model over 21 days. Two MIA (2 mg) groups (including one lidocaine treatment group) and one sham group (0.9 % saline) received an intra-articular (50

---

<sup>1</sup> Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Department of Biomedical Sciences, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Osteoarthritis Research Unit, Research Center Hospital of Montreal University (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

<sup>4</sup> CiToxLAB North America Inc., Laval, Quebec, Canada

¶Both authors contributed equally to this work, and as such must be considered as first co-authors

μL) injection. No effect of environment (observer, inverted circadian cycle or exercise) was observed; all tested methods except mechanical sensitivity (ICC <0.3), offered good repeatability (ICC ≥0.7). The most reliable acclimatization protocol included five assessments over two weeks. MIA-related osteoarthritic change in pain was demonstrated with static weight-bearing, punctate tactile allodynia evaluation, treadmill exercise and operant PEAP, the latter being the most responsive to analgesic intra-articular lidocaine. Substance P and calcitonin gene-related peptide were higher in MIA groups compared to naive (adjusted *P* (adj-*P*) = 0.016) or sham-treated (adj-*P* = 0.029) rats. Repeated post-MIA lidocaine injection resulted in 34 times lower downregulation for spinal substance P compared to MIA alone (adj-*P* = 0.029), with a concomitant increase of 17 % in time spent on the PEAP dark side (indicative of increased comfort). This study of normal rats and rats with pain established the most reliable and sensitive pain assessment methods and an optimized acclimatization protocol. Operant PEAP testing was more responsive to lidocaine analgesia than other tests used, while neuropeptide spinal concentration is an objective quantification method attractive to support and validate different centralized pain functional assessment methods.

### **2.3.2 Keywords**

Animal preclinical model, Osteoarthritis, Monosodium iodoacetate, Methods, Validation, Acclimatization, Pain metrology, Neuropeptide

### **2.3.3 Introduction**

Osteoarthritis (OA), the most common of all arthropathies in our aging population, is a leading cause of disability and represents a large (and growing) worldwide socio-economic cost (Little and Hunter 2013). It affects approximately 30 million adults in the USA (Lawrence, Felson et al., 2008), and this number is expected to double by 2020 (Hootman and Helmick 2006), with longer life expectancy and the increasing incidence of obesity, two major risk factors for the disease. Despite critical importance in drug development, translation of OA therapies focusing either on structure (disease-modifying OA drugs) or pain (symptom-modifying OA drugs) from the bench to bedside has slowed (Kissin 2010; Little and Hunter 2013; Palmer and Sundstrom 2013). Differences between preclinical OA models and the disease evaluated in clinical trials contribute to this failure. Rising criticism is noted over the

classic translational research, which failed to predict efficacy of chronic pain treatments (Dolgin 2010; Mao 2009; Mogil 2009; Yeziarski and Vierck 2011). Most critics have targeted the poor validity and clinical relevance of experimental pain models using laboratory animals (Blackburn-Munro 2004; Vierck, Hansson et al., 2008). It has also been hypothesized that current animal models are too reliant on evoked (reflexive) withdrawal responses and that development of meaningful assessment tools allowing, for instance, the measurement of continuous spontaneous pain, might help to translate experimental data to clinical practice (Dolgin 2010; Mogil and Crager 2004).

Naturally occurring OA models are recognized to present a pathophysiology closest to clinical OA, particularly in large animals (Moreau, Pelletier et al., 2013), but also entail experimental disadvantages (long period to onset, and variability of disease development). In contrast, chemical models cause the most rapidly progressing OA, requiring less invasive procedures and enabling standardization (with increased sample homogeneity). The monosodium iodoacetate (MIA) chemical OA model as described 25 years ago induces cartilage degeneration by disruption of chondrocyte metabolism (*i.e.*, breaking down the cellular aerobic glycolysis). In rats, the MIA model is well-established and resembles the histological and pain-related characteristics of human degenerative OA (Bove, Calcaterra et al., 2003; Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Ferreira-Gomes, Adaes, Sousa et al., 2012; Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Guzman, Evans et al., 2003; Kelly, Dunham et al., 2012; Kobayashi, Imaizumi et al., 2003; Liu, Okun et al., 2011; Marker and Pomonis 2012; Nagase, Kumakura et al., 2012; Okun, Liu et al., 2012; Orita, Ishikawa et al., 2011; Pomonis, Boulet et al., 2005; Thakur, Rahman et al., 2012; Vonsy, Ghandehari et al., 2009). Owing to the extensive description of the pain response in rats, the MIA OA model was proposed as a standard OA model for pain assessment (Lampropoulou-Adamidou, Lelovas et al., 2013; Marker and Pomonis 2012).

The quality of pain assessment methodologies is a cornerstone of preclinical studies targeting new analgesics (Barrot 2012; Blackburn-Munro 2004; Edwards, Sarlani et al., 2005; Fernihough, Gentry et al., 2004; Mao 2009; Mogil and Crager 2004; Vierck, Hansson et al., 2008). Three different categories of pain expression can be evaluated in rats: reflexive measures, spontaneous measures and operant responses (Barrot 2012; Mogil 2009). First, reflexive measures using stimulus-evoked responses are commonly used in rats to assess



potential hyperalgesia and allodynia, recognized as clinical expression of neuropathic pain (nociceptive sensitization) component (Boyce-Rustay, Zhong et al., 2010; Mogil 2009; Vierck, Kline et al., 2004; Yalcin, Charlet et al., 2009). These measures are generated by exposure to thermal, mechanical or electrical stimulus, involving mainly spinal level pain processing, and are also increasingly present in human quantitative sensory testing pain characterization (Cruz-Almeida and Fillingim 2013; Negus, Vanderah et al., 2006; Suokas, Walsh et al., 2012). Second, spontaneous measures can be useful to quantify pain and/or wellbeing (Mogil 2009). For example, kinetic (static or dynamic weight distribution) (Bove, Calcaterra et al., 2003) or kinematic (Allen, Mata et al., 2012) (ambulation evaluation or characterization) measurement, and spontaneous activity (Nagase, Kumakura et al., 2012) can indirectly assess quality of life in OA models. Pain-induced behaviors (scratching/licking/biting, hypophagia, vocalisation, *etc.*) should also be considered in this category (Negus, Vanderah et al., 2006). Finally, operant responses have been more recently introduced to characterize pain in animal models (Fuchs and McNabb 2012; LaBuda and Fuchs 2000; Li 2013; Mogil 2009; Navratilova, Xie et al., 2013; Vierck, Kline et al., 2003; Vierck, Kline et al., 2004). Operant testing is opposite to reflexive response testing as it allows the quantification of behavioral responses at higher levels of the brain, reproducing multiple dimensions of pain, including affective and cognitive changes and not only sensory-discriminative perception (King, Devine et al., 2003; Li 2013; Mauderli, Acosta-Rua et al., 2000; Navratilova, Xie et al., 2013). This type of measure allows the observer to evaluate the aversive component of pain as operant tests give the animal an opportunity to avoid the painful condition (Boyce-Rustay, Zhong et al., 2010; Fuchs and McNabb 2012; LaBuda and Fuchs 2000; Li 2013; Navratilova, Xie et al., 2013; Pedersen and Blackburn-Munro 2006; Vierck, Acosta-Rua et al., 2002; Zhang, Zhang et al., 2011).

In patients OA, pain is a combination of inflammatory, immune and neurogenic components participating in the hypersensitivity syndrome. Central sensitization (Woolf 1996) mechanisms include various biochemical processes such as increased spinal release of neurotransmitters and neuromodulators, and increased excitability of postsynaptic neurons. In an OA (Ferland, Pailleux et al., 2011) and arthritis (Calza, Pozza et al., 1998) rat model, higher levels of neuropeptides, such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) have been found in the spinal cord. Thus, the nervous system modulation seems to play a critical role in the development of the disease (Levine, Collier et al., 1985). The contribution of these

spinal neuromediators to neurogenic inflammation-mediated chronic pain in OA and concomitant changes in functional pain assessment methods has not been fully established.

With such a variety of methods for pain and analgesic response assessment, it is difficult to opt for the method(s) most adapted to specific conditions. The current study undertook to establish, the reliability of a panel of pain assessment methods (including reflexive, spontaneous and operant testing) in normal rats, and the influence of environmental conditions, including acclimatization and experimental conditions of manipulation (observer, inverted circadian cycle, and exercise). The most reliable methods were then used to characterize OA pain in the well-established chemical MIA model in rats, while conducting concurrent validation of pain assessment methods in relation to the expression of different spinal neuropeptides and their responsiveness to treatment with intra-articular lidocaine.

## **2.3.4 Materials and methods**

### **2.3.4.1 Ethics statement**

During the study, care and use of animals were subject to and approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of Université de Montréal (#Rech-1495) and conducted in accordance with principles outlined in the current Guide to the Care and Use of Experimental Animals published by the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health.

### **2.3.4.2 Animals**

The present study was conducted on female (n = 63; excluding spares) Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) ranging from 225-300 g in weight at the beginning of experiment. The animals were housed under regular laboratory conditions and maintained under a light-dark cycle with food and water provided *ad libitum*. Body weight was obtained weekly. At the end of each experiment, the animals were returned to their housing colony.

### **2.3.4.3 Phase 1: reliability of pain assessment methods in normal rats**

#### *2.3.4.3.1 Experimental design*

The Phase 1 included a total of 39 normal rats distributed in 8 groups. First, the repeatability of measurements was tested for the influence of environment including observer, inverted circadian cycle (activity during the day), and exercise (2 groups of 5 animals in cross-over). Additionally, repeatability over an extended period was tested again for static weight-bearing (SWB; one group of four animals also tested for exercise effect), and for tactile sensitivity and place escape/avoidance paradigm (PEAP) operant test (one group of five animals). Second, using the most reliable methods only, the influence of four acclimatization protocols (four groups of five animals) was tested in order to determine the most effective approach to obtain predictable data with low variability. Different pain assessment methods were selected to include reflexive, spontaneous behavior and operant measures.

#### *2.3.4.3.2 Influence of environment*

First, rats ( $n = 10$ ) were randomly distributed into two groups of five. Animals were acclimated to the test apparatus on two occasions at day -3 and -1 before starting the experimentation. In a crossover design, the animals were subsequently assessed for three repeated days during light (10:00 – 14:00) and dark (20:00 – 24:00) cycles to test the influence of inverted circadian cycles. Both cycles were separated by a 3-day washout period without assessment. Dark cycle evaluations were performed under low-intensity red light. Animals were tested on each of six assessment days by two observers, with the following methods in this order of evaluation: mechanical and tactile sensitivity, SWB, treadmill exercise, mechanical and tactile sensitivity, SWB, PEAP operant test (without nociceptive stimulation) and rotarod acceptance. The mechanical and tactile nociceptive thresholds and SWB evaluation were performed before and after the treadmill exercise in order to verify the influence of exercise on these three pain assessment methods. Finally, PEAP and rotarod were performed at the end of the evaluation schedule to ensure respectively, that the length of the test, and possible falling from the test device would not impair the other outcomes. To test inter-rater reliability, two female observers were selected for their different levels of experience in laboratory animals (one intermediate, one with advanced expertise).

Second, in complementary studies about test repeatability (after an acclimatization on two occasions, at day -3 and -1), SWB was specifically retested over 15 days with two SWB assessments separated by a treadmill session (then testing again the potential effect of exercise on SWB) with a group of four rats. This evaluation was done daily, from day 1 to 5, then on days 8 and 15.

Finally, the repeatability of measurements of tactile sensitivity and PEAP (with nociceptive stimulation) was tested in a group of five rats over 25 days. These evaluations were done daily, from days 1 to 15, and repeated on days 18 and 25.

#### *2.3.4.3.3 Influence of acclimatization protocols*

In order to determine the most efficient acclimatization protocol associated with the most repeatable data (previously obtained), the next experiment was conducted in a total of 20 animals (four groups of 5 animals). Briefly, over two weeks, different acclimatization protocols were tested and included 8 (days -14, -13, -12, -11, -10, -8, -6, -1), 6 (days -14, -8, -7, -6, -5, -1), 5 (days -14, -7, -5, -3, -1) or 4 (-14, -8, -6, -1) days of evaluation. The order of assessment was SWB, tactile and mechanical sensitivity, PEAP with nociceptive stimulation, and treadmill. The schedule of pain evaluation methods was determined to obtain nociceptive thresholds values before placing the animal on the operant testing device where many paw stimulations were elicited (see subsequent description).

#### *2.3.4.3.4 Pain Assessment Methods*

##### *2.3.4.3.4.1 Mechanical sensitivity*

The mechanical sensitivity was assessed by measuring the paw withdrawal threshold (PWT) to an increasing pressure stimulus placed on the dorsal surface of the hind paw using an algometer (Randall Selitto test Paw Pressure Meter<sup>®</sup>, IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA), employing a wedge-shaped probe (1.75 mm<sup>2</sup> of surface) and a cut-off value set at 250 g. The animals were placed in a sling apparatus (Lomir Biomedical Inc., Notre-Dame-de-l'Île-Perrot, QC, Canada). The probe was applied once on the dorsal surface at a steadily increasing pressure. The PWT was determined when the animal removed the paw from the apparatus, and the required pressure was recorded. Withdrawal thresholds were measured on the right and left hind paws. The data were expressed as PWT in grams.

#### 2.3.4.3.4.2 Tactile sensitivity

First, the animal was placed inside an elevated metal grid cage to allow just enough space to the rat to move while being restricted. After the rat exploration session during the first 2 minutes, the tactile sensitivity was assessed using an Electronic von Frey Anesthesiometer<sup>®</sup> (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) applied to the plantar surface of the hind paws and by measuring the PWT to von Frey ascending mechanical stimuli. Gradually increasing pressure was applied with a mechanical von Frey polypropylene probe (0.7 mm<sup>2</sup>, Rigid Tip<sup>®</sup>, IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) fitted to a handheld force transducer. The rigid tip was placed perpendicularly into the mid-plantar surface of the paw. The stimulus was continued until the hind paw was withdrawn or elevated such that the force leveled off. Actions such as vocalization, agitation, jumping, and avoidance were considered indicative of the PWT. Voluntary movements associated with locomotion were not considered to be a withdrawal response. The peak of force in grams was recorded with a cutoff value at 100 g. For each animal, triplicates of each hind paw were taken with a 60-s interval between each stimulus.

#### 2.3.4.3.4.3 Static weight bearing

The weight distribution through the right and left knee was assessed using an Incapacitance Meter<sup>®</sup> (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) to measure SWB distribution in the two hind limbs. The force exerted by each hind limb was measured and analyzed in grams, but reported in percentage of total body weight (%BW) to normalize the data. Rats were allowed to acclimate to the testing apparatus and when stationary, readings were taken over a 3-s period. Triplicates were taken simultaneously for each limb at each time point.

#### 2.3.4.3.4.4 Treadmill exercise

All rats underwent forced training over a 20-minute period at constant treadmill speed (11 m/min) (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA). To force the animal to exercise on the treadmill belt, each lane was equipped with an independent shocker grid. The intensity of the shocker grid was kept at the minimum required to keep the animal on the exercise belt. The treadmill number of total crossings (TNTC) was recorded over the whole period, but also reported in blocks of 5 min, to potentially detect a within-time change in activity. A total

crossing was considered completed when the animal crossed the entire length of the lane. The TNTC was used as an indicator of exercise and/or performance. When the rats were running continuously on the belt, they were exposed to maximal intensity exercise, as they were not pausing, causing them to cross the entire length of the motorized lane.

#### 2.3.4.3.4.5 Operant testing

The PEAP was used as an operant testing apparatus (Boyce-Rustay, Zhong et al., 2010; Fuchs and McNabb 2012; Zhang, Zhang et al., 2011). Rats were placed into test cage apparatus that was painted half white and half black. Neither side was illuminated with additional light. With the cage on an elevated metal grid, the observer, located below, determined the preferential location of the rat. The 20-minute observation period began after 2 minutes of acclimatization/exploration to the test environment on each occasion.

##### 2.3.4.3.4.5.1 Operant testing without nociceptive stimulation

The percentage of time spent on the black or white side of the test apparatus was calculated from observation of the preferential location every 15 s.

##### 2.3.4.3.4.5.2 Operant testing with nociceptive stimulation

If the rat was on the black side of the test apparatus, the plantar surface of the right (ipsilateral to possible MIA intra-articular injection) hind paw (RHP) was stimulated with a thin wire (60 g) every 15 s, to prompt withdrawal of the limb. When the rat was on the white side of the cage, a similar mechanical stimulation was applied, but to the plantar surface of the left (contralateral) hind paw (LHP). The percentage of time in the black and white side of the test apparatus was calculated from observation of the preferential location every 15 s. The calculations were sequenced by successive blocks ( $n = 4$ ) of 5-minute periods. Moreover, the total number of crossings from the white to the dark side was noted to detect any decrease in activity. If a rat remained in the crossing tunnel, it would be stimulated to advance and complete its crossing.

#### 2.3.4.3.4.6 Rotarod

Using a Rotamex 4/8<sup>®</sup> (Columbus Instruments Inc., Columbus, OH, USA) with a previously published protocol (Vonsy, Ghandehari et al., 2009), the rats were exposed to an acceleration speed of 5 to 16 rpm, over 60 s, before being maintained at this speed, while the time before falling was monitored with a cutoff time at 3 minutes.

### 2.3.4.4 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model

#### 2.3.4.4.1 *Experimental design*

In the second phase, a pilot study ( $n = 24$  rats) was conducted to test the concurrent validity of different functional and neuropeptide pain assessment methods in the MIA rat OA model. A single intra-articular injection of MIA was performed in the right knee of 16 animals distributed among two groups ( $n = 8$  each). An additional sham group ( $n = 8$ ) received a single intra-articular injection (50  $\mu$ L) of 0.9 % NaCl. For the purpose of the study, one of the two MIA groups also received a punctate lidocaine (L) injection (MIA-L group) in the right knee on days 7, 14 and 21. At the end of the 21 days of the experimentation, all animals were euthanized with an overdose of isoflurane and a sacrifice by transaction of the cervical spine before spinal cord collection.

#### 2.3.4.4.2 *Acclimatization period and baseline assessment*

The study began with an acclimatization period for the selected optimal outcomes (SWB, tactile sensitivity, PEAP, rotarod and treadmill), according to the optimal acclimatization protocol of five occurrences (days -14, -7, -5, -3, -1) obtained in phase 1. Because of pain induction in phase 2, tactile sensitivity could be considered as punctate tactile allodynia evaluation (PTAE). Baseline values were acquired at day -1 in this order of evaluation, following the above-described testing procedures: SWB, PTAE, PEAP with nociceptive stimulation, rotarod and treadmill, with intra-articular injection of MIA at day 0 in the right knee.

#### 2.3.4.4.3 *Intra-articular injection*

On day 0, fasted (3-6 h) rats from all groups were premedicated with buprenorphine hydrochloride (0.02 mg/kg IM; Buprenex<sup>®</sup> injectable, Reckitt Benckiser Inc., Mississauga, ON,

Canada) and mask-anesthetized with a 2 % isoflurane – O<sub>2</sub> mixture. After surgical preparation, a single intra-articular injection of 2 mg MIA (Monosodium iodoacetate, BioUltra<sup>®</sup>, ≥98 %, Sigma-Aldrich Canada Co., no. I9148-5G, Oakville, ON, Canada) dissolved in isotonic saline, or saline 0.9 % (both 50 µL volume) was administered through the infrapatellar ligament of the right knee, using a 26-gauge, 0.5 inch needle mounted on a 0.5 mL syringe. On days 7, 14, and 21 post-MIA injection, 25 minutes before functional assessment, rats from the MIA-L group were again similarly anesthetized with a single intra-articular injection of lidocaine through the infrapatellar ligament of the right knee. Lidocaine Neat<sup>®</sup> (2 %, Zoetis Canada, Kirkland, QC, Canada) was injected at a volume of 50 µL using a 26-gauge, 0.5 inch needle mounted on a 0.5 mL syringe.

#### *2.3.4.4.4 Post-injection evaluation*

The assessments were performed according to the specific schedules of the different groups on days 3, 7, 14 and 21 post injection, and conducted as described for phase 1 section. For the MIA-L group on days 7, 14, and 21, the evaluation started 25 minutes after the animals recovery from anesthesia. The evaluation sequence was as follows: SWB (% BW), PTAE (grams), PEAP (percentage of time spent on the dark side), rotarod (seconds) and treadmill (TNTC). The schedule of evaluation was designed in order to obtain the SWB at rest and the PTAE data before the operant testing evaluation as this test elicits many PWT stimulations.

#### *2.3.4.4.5 Proteomic analysis*

##### *2.3.4.4.5.1 Reagents and solutions*

Acetic anhydride 99.5 % (Ac<sub>2</sub>O) and ammonium bicarbonate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) were obtained from Sigma-Aldrich Inc. (Saint-Louis, MO, USA). SP and CGRP were purchased from Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Belmont, CA, USA). Acetonitrile was purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. (NJ, USA), trifluoroacetic acid, formic acid and ammonium hydroxide 28.0-30.0 % (NH<sub>4</sub>OH) were purchased from J.T. Baker<sup>®</sup> (Phillipsburg, NJ, USA). Standard solutions were prepared as previously performed (Beaudry, Ferland et al., 2009).



#### 2.3.4.4.5.2 Instrumentation

The tandem mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC-MS/MS) system comprises a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo LCQ Advantage Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA). Data were acquired and analyzed with Xcalibur™ 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA), and regression analysis were performed with PRISM® (version 5.0d) (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the peak-area ratios of targeted neuropeptides (SP or CGRP) and the acetylated SP analogue internal standard.

#### 2.3.4.4.5.3 Bioanalytical methods

Acetylated SP was used as internal standard. The reaction was performed as previously described (Beaudry, Ferland et al., 2009) and the analytical method used was also based on a previously published method (Che and Fricker 2002). The internal standard solution was tested by HPLC-MS/MS in multiple reactions monitoring (MRM) mode and no residual SP were detected.

#### 2.3.4.4.5.4 Spinal cord sample preparation

At the end of the 21 days of experimentation, the entire spinal cord tissue of rats (n = 24) was rapidly collected by a flush of saline within the lumbar spinal canal following deep anaesthesia with isoflurane and a sacrifice by transaction of the cervical spine. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  pending analysis. Each spinal cord was weighed accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of phosphate-buffered saline solution (PBS) 0.01 M at a ratio of 1:5 (v/v) and protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, ON, Canada, no.PP8340) at the same ratio. The samples were sonicated and the homogenate was mixed with acetonitrile at a ratio of 1:1 (v/v) to remove larger proteins. The samples were vortexed and centrifuged 10 min ( $\times 12,000$  g) and the supernatant was transferred into an injection vial then spiked with the internal standard solution at a ratio of 1:1 (v/v). The spinal cords from a naive group (n = 5) in phase 1 were also collected

in order to obtain baseline value from normal rats to normalized values obtained from MIA, MIA-L and sham groups.

#### **2.3.4.5 Statistical Analysis**

All statistical analyses were performed two-sided with an alpha value set at 0.05 (phase 1) or 0.10 (phase 2) using a statistical software program (SAS system for Windows, version 9.2, Cary, NC, USA). The alpha level value for phase 2 was set at 0.1 because this phase was an exploratory study. In a pilot study, it is acceptable to set a higher alpha level value when the study has the hopes of finding an effect that could lead to a promising scientific discovery (Curran-Everett and Benos 2004) in order to increase the power (consequently decreasing type II error risk), but increasing the chances of making a type I error (*i.e.*, saying there is a difference when there is not). To be consistent with the statistical rules of correction for multiple comparisons, phase 2 results were presented as adjusted *P* value (*adj-P*) because the values obtained in the statistical report need to be multiplied by the total number of comparisons. The normality of the outcomes was verified using the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance was assessed using the absolute values of the residuals of the mixed model, when appropriate.

##### *2.3.4.5.1 Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats*

For mechanical nociceptive thresholds and SWB, the effect of the circadian cycle was assessed using the paired *t* test adapted for a crossover design. Moreover, the effect of covariates of interest, namely observer, exercise, limb (when both left and right limbs were tested) or trials (when replicates were conducted), was assessed using a general linear model. Generalized linear mixed model analyses for repeated measures were conducted to test the effect of groups on TNTC and rotarod (lognormal distribution), and PEAP (Poisson distribution). Models accounted for baseline measurement using baseline as covariates. This enabled assessment of the effect of the procedure over time using each subject as its own control. For each model, the best structure of the covariance model was assessed using information criteria that measure the relative fit of competing covariance models. When comparing the 5-minute periods, the Bonferroni adjustment was applied (initial alpha value divided by 4).

Outcome repeatability (test-retest reliability) was assessed by computing intraclass correlation coefficient (ICC). The ICC is a measure of the proportion of variance that is attributable to objects of measurement. Quantifying the test-retest reliability, the closer the ICC is to 1.0, the higher the reliability and the lower the error variance (Weir 2005). A ratio of 0.3-0.4 indicates fair agreement, 0.5-0.6 moderate agreement, 0.7-0.8 strong agreement, and >0.8 indicates almost perfect agreement. Moreover, the coefficient of variation (CV), as normalized measure of dispersion of the distribution, was used to test the effect of the proposed acclimatization protocols. The CV for each variable was calculated at day -14 (initial assessment), and the variation in CV was assessed at the end of each acclimatization protocol as the CV ratio of day -1 (final assessment) to day -14. At the initial assessment (day -14), the CV interpretation was as follows: <10 % indicated almost perfect dispersion, 11-25 % light dispersion, 26-40 % fair dispersion. The day -1 / day -14 CV ratio indicated an improvement (decrease in variability) related to the acclimatization protocol if it was <1, a deterioration (increase in variability) if >1.

#### 2.3.4.5.2 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model

The SWB and PTAE data were expressed as the average obtained from the three trials on the RHP. Data were then analyzed using linear mixed models (SWB and PTAE) or generalized linear mixed models for repeated measures. Treatment groups and day were considered as fixed effect and animals in groups as random effect. Models accounted for baseline measurement using baseline as covariate. For each model, the best structure of the covariance model was assessed using a graphical method (plots of covariance *versus* lag in time between pairs of observation compared to different covariance models), and using information criteria that measure the relative fit of competing covariance models. When multiple comparisons were carried out, a Tukey-Kramer adjustment was used to obtain adj-*P* values. Neuropeptide data were analysed with the unpaired exact Wilcoxon test with an alpha value set at 0.10 following a non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

## 2.3.5 Results

### 2.3.5.1 Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats

#### 2.3.5.1.1 Data variability and influence of environment

The repeatability of measurements made with different assessment methods was tested in normal rats as well as the influence of environment, including observer, inverted circadian cycle (activity during the day), exercise, limb, and trial, when tested.

##### 2.3.5.1.1.1 Mechanical sensitivity

We did not find any observer, circadian cycle, exercise, or limb effect in the PWT measured with the Randall Selitto test Paw Pressure Meter<sup>®</sup>. However, the data obtained with this test were highly variable between individuals and not repeatable (ICC <0.3).

##### 2.3.5.1.1.2 Tactile sensitivity

The PWT measured with the Electronic von Frey Anesthesiometer<sup>®</sup> in normal rats gave average values of 40-80 g in both hind limbs. The observer, the circadian cycle, and the exercise did not produce any effect on tactile sensitivity. No significant difference between the right and left hind limbs, or trial (in the triplicates) effect was observed. However, the data presented a marked variability over the whole period (6 days in total) with an ICC for both hind limbs <0.5. Following repetition of the experiment in five rats over 25 days, the ICC improved after excluding the first 2 weeks of daily evaluation. More precisely, the ICC for days 15, 18, and 25 was >0.8 for both hind limbs (**Tableau VII**).

**Tableau VII. Test-retest reliability of the tactile sensitivity evaluation.**

	LHP	RHP
ICC over the whole period	0.78	0.26
ICC for days 7, 15, 18, and 25	0.79	0.27
ICC for days 15, 18, and 25	0.84	0.81

A group of normal rats (n = 5) was tested with the Electronic von Frey Anesthesiometer<sup>®</sup> daily from day 1 to 15 and then on days 18 and 25. The intraclass correlation coefficients (ICCs) for values calculated for the entire evaluation period were compared to values calculated after exclusion of the first week of assessment. *LHP* left hind paw, *RHP* right hind paw

### 2.3.5.1.1.3 Static weight bearing

In normal animals, the Incapacitance Meter<sup>®</sup> apparatus measured average values of weight distributed over each hind limb between 35 and 38 % BW. The observer, the circadian cycle, and the exercise did not produce any effect on SWB. No significant difference between the right and left hind limbs, or trial effect (in the triplicates) was observed. When considering the last two days of assessment (in comparison to the whole period of 6 days), the ICC improved (**Tableau VII**), and this was particularly evident for the SWB ICC after exercise (ICC >0.7 in both hind limbs for the last 2 days of assessment). This suggests that the treadmill exercise slightly decreased inter-individual variability in SWB measurement. Finally, following repetition of evaluation over 15 days with in four rats, the ICC improved after excluding the first week of daily evaluation (days 1 to 5), demonstrating a value  $\geq 0.66$  for days 8 and 15 in both hind limbs (**Tableau VII**).

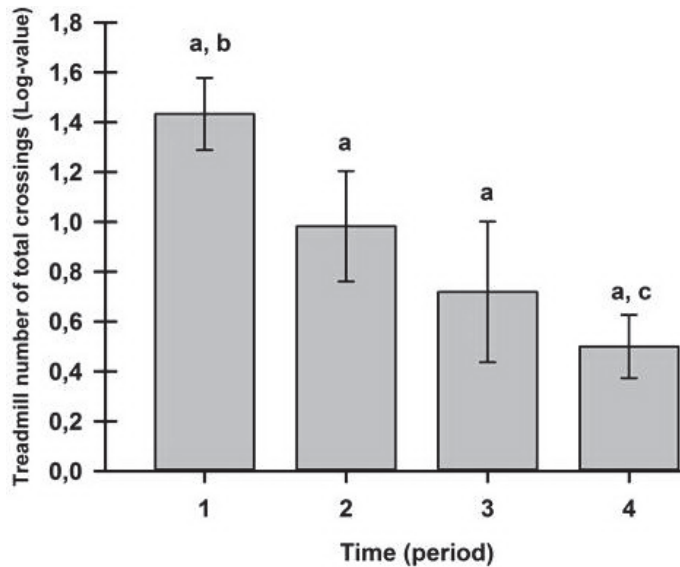
**Tableau VIII. Test-retest reliability of the static weight bearing.**

	Before exercise		After exercise	
	LHP	RHP	LHP	RHP
ICC over the whole period	0.00	0.00	0.00	0.23
ICC for days 8 and 15	0.67	0.66	0.66	0.76

A group of normal rats ( $n = 4$ ) was tested for static weight bearing before and after treadmill exercise period daily from days 1 to 5 and then on days 8 and 15. The intraclass correlation coefficients (ICCs) calculated for the entire evaluation period were compared to ICCs calculated after exclusion of the first week of assessment. *LHP* left hind paw, *RHP* right hind paw

### 2.3.5.1.1.4 Treadmill

The treadmill exercise sessions were generally well accepted by female Sprague-Dawley rats (84 % acceptability). Neither the observer, nor the circadian cycle produced any effect on the TNTC. The TNTC was extremely repeatable with an ICC of 0.84. A period effect was demonstrated ( $P = 0.003$ ) in the 15-day study the four rats (**Figure 21**). Post hoc analysis showed that the initial and final 5-minute periods were different for TNTC ( $P = 0.0002$ ), whereas both intermediate 5-minute periods (numbers 2 and 3) were highly repeatable with an ICC of 0.73 and 0.92, respectively.

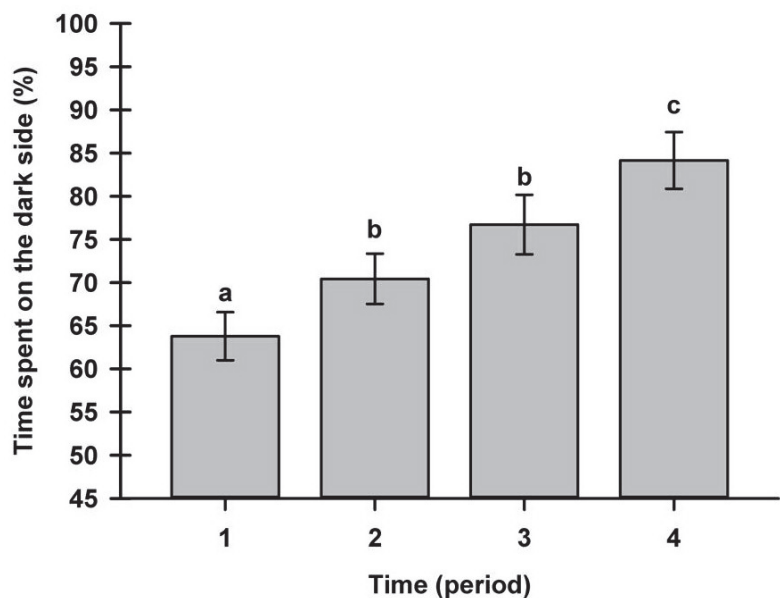


**Figure 21. Treadmill exercise repeatability.**

Data are presented as the least squares mean  $\pm$  standard error of the mean. A group of four animals was tested on the treadmill, recording the number of total crossings over 20 minutes (period 1 = 0-5 minutes, period 2 = 5-10 minutes, period 3 = 10-15 minutes, and period 4 = 15-20 minutes), daily from day 1 to 5 and then on days 8 and 15. The treadmill numbers of total crossings were transformed to fit a lognormal distribution. <sup>a,b,c</sup> Statistically significant different inter-period statistical differences (adjusted  $P$  value = 0.002)

#### 2.3.5.1.1.5 Place escape/avoidance paradigm

The first experiment with operant testing was done without nociceptive stimulus. Neither the observer, nor the circadian cycle produced any effect on the preferential localization. The localization was highly repeatable between animals with an ICC of 0.90, where the rats spent 91 % of their time on the black side. A period effect was demonstrated ( $P < 0.0001$ ) in the 25-day study of five rats (**Figure 22**). The PEAP assessment with nociceptive stimulation demonstrated once again a robust repeatability, with an ICC of 0.83, and rats spent 81 % of their time on the black side. The post hoc analysis showed that the intermediate 5-minute periods (numbers 2 and 3) were similar in percentage of time, and were highly repeatable and different ( $P \leq 0.0216$ ) from the initial and final 5-minutes periods.



**Figure 22. Place escape/avoidance paradigm operant test repeatability (least squares mean  $\pm$  standard error of the mean).**

A group of five animals underwent the place escape/avoidance paradigm operant test (percentage of the time spent on the dark side) over a 20-minute (period 1 = 0-5 minutes, period 2 = 5-10 minutes, period 3 = 10-15 minutes, and period 4 = 15-20 minutes) daily from days 1 to 15, and then on days 18 and 25. <sup>a,b,c</sup> Significant inter-period differences (adjusted  $P$  value  $\leq 0.0216$ )

#### 2.3.5.1.1.6 Rotarod

Neither the observer, nor the circadian cycle produced any effect on the performance time in the rotarod, and this performance time was highly repeatable with an ICC of 0.92.

#### 2.3.5.1.2 Influence of acclimatization protocols and comparison of assessment method variability

When looking at the different assessment methods for the initial day of acclimatization (day -14), inter-individual variability (CV) appeared lower for the SWB, followed by PEAP, tactile sensitivity and treadmill (TNTC) evaluation, with mechanical sensitivity last (**Tableau IX**). The variation in CV at day -1, normalized to day -14, as tested by the day -1 / day -14 CV ratio was compared between acclimatization protocols for the different pain assessment methods (**Tableau IX**). The most intensive protocol with the highest number of acclimatization procedures ( $n = 8$ ) presented the lowest variability between day -1 and -14, similar to the protocol with 6 or 5 days of acclimatization. The protocol with only 4 days of acclimatization yielded the highest variations in CV. The acclimatization protocol using five occurrences of

exposition to different assessment methods appeared the most appropriate to limit variability in assessment.

**Tableau IX. Coefficient of variation (CV) for each outcome and variation in CV between four protocols of acclimatization.**

Functional evaluation <sup>a</sup>	8 days		6 days		5 days		4 days	
	CV (D-14)	CV* ratio	CV (D-14)	CV* ratio	CV (D-14)	CV* ratio	CV (D-14)	CV* ratio
SWB	17.3	<b>0.72</b>	31.2	<b>0.30</b>	11.7	<b>0.62</b>	12.2	<b>0.67</b>
PEAP	23.8	1.01	24.1	1.07	21.3	0.97	22.8	1.11
TS	42.9	<b>0.85</b>	22.9	1.24	20.4	1.01	27.4	1.80
TNTC	36.9	1.10	106.5	<b>0.54</b>	31.2	0.91	38.0	1.92
MS	63.3	<b>0.74</b>	71.8	1.07	72.2	<b>0.71</b>	75.3	<b>0.53</b>

<sup>a</sup>The functional evaluation includes the values recorded for the right hind limb, when available (static weight bearing (SWB), tactile sensitivity (TS), mechanical sensitivity (MS)), or the response of the animal (place escape/avoidance paradigm (PEAP) and treadmill number of total crossings (TNTC)). \*The CV values calculated on day -1 were normalized to the CV values on day -14 (D-14) to test the influence of the acclimatization protocol on the outcome measures. A day -1/day -14 CV ratio value <1 was indicative of improvement in variability and is presented in bold italics

### 2.3.5.2 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model

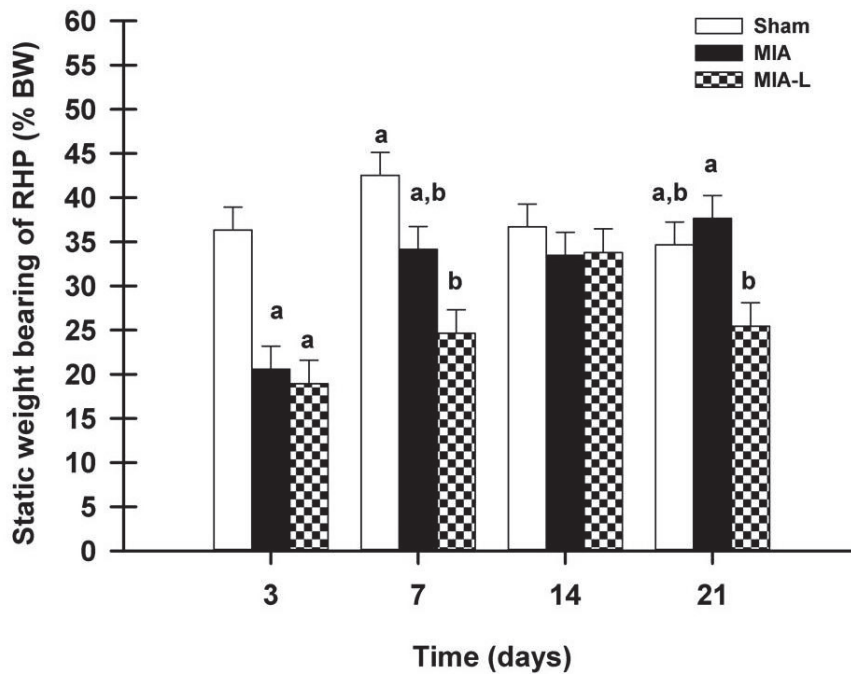
The MIA injection successfully induced pain-related changes as assessed by SWB, PTAE, PEAP, and TNTC. However, the rotarod was not sensitive to MIA-induced pain, as all groups presenting similar (maximal) time of acceptance. In consequence, no further analysis was conducted with this testing modality. The Sham injection was not totally neutral when compared to baseline values: while no effect was present for SWB or TNTC, the Sham group presented a transient decrease in PTAE (days 7 and 14) and PEAP (days 3 and 7). The response to lidocaine injection was variable with the assessment method: a clear analgesic effect was noted with PTAE (on days 7 and 14), and PEAP (on days 7, 14 and 21); a trend toward better performance was observed with TNTC, but no difference with MIA was observed for SWB. Neuropeptide spinal quantification permitted validation of the lidocaine treatment effect and the pain generated by MIA injection.

#### 2.3.5.2.1 Static weight bearing

Analysis of SWB data demonstrated a group effect ( $P = 0.0005$ ), a time effect ( $P < 0.0001$ ) and a time x group effect ( $P = 0.005$ ). In the MIA group, the nadir of weight force was observed on day 3 and was different from values recorded on days 7 (adj- $P = 0.005$ ), 14 (adj- $P$



= 0.01) and 21 (adj- $P$  = 0.001) (**Figure 23**). No significant difference within time was observed for the sham group, whereas in the MIA-L group, day 3 RHP SWB (without lidocaine injection) was lower than on day 14 (adj- $P$  = 0.001). Compared to the sham group, the RHP SWB decreased on day 3 in the MIA (adj- $P$  = 0.002) and the MIA-L (adj- $P$  = 0.001). Subsequently, the RHP SWB in the MIA group returned to levels similar to those in the sham group, and at no time point of evaluation did the lidocaine injection provide any benefit.



**Figure 23. Static weight-bearing (SWB) evolution after induction of osteoarthritis (least squares mean  $\pm$  standard error of the mean).**

On day 3, the monosodium iodoacetate (*MIA*) intra-articular injection in the right knee induced asymmetrical weight distribution in the rats injected with MIA (adjusted  $P$  value (adj- $P$ ) = 0.0024) and rats injected with MIA and punctate lidocaine (*MIA-L*) (adj- $P$  = 0.0011) compared to rats injected with 0.9 % saline (sham). Subsequently, a statistically significant difference in right hind paw SWB was only observed between the sham and MIA-L groups at days 7 and 21. % *BW* percentage of body weight. <sup>a,b</sup> Significant inter-group statistical differences

#### 2.3.5.2.2 Punctate tactile allodynia evaluation

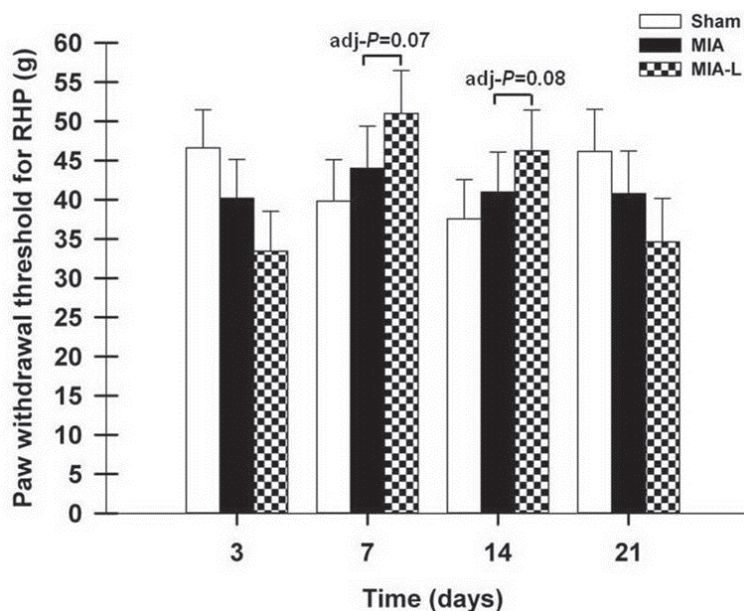
Descriptive statistics for the RHP PTAE over the evaluation days are provided in **Tableau X**.

**Tableau X. Mean and standard deviation of the punctate tactile allodynia evaluation by experimental group over time.**

Experimental Group	Days									
	-1		3		7		14		21	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
MIA	53.8	11.2	39.2	13.1	43.1	13.7	40.0	10.0	39.8	8.5
MIA-L	70.4	16.8	35.0	13.8	52.6	12.7	47.8	14.3	36.2	17.8
Sham	56.3	16.9	49.0	14.8	39.2	16.6	37.0	17.6	45.6	17.0

Descriptive statistics of the punctate tactile allodynia evaluation (PTAE) of the right hind paw. The measure was obtained for the three groups (eight animals per group) in grams on days 3, 7, 14 and 21 following the intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA). Intra-articular injection was performed on day 0 (2 mg of MIA for the MIA and rats injected with monosodium iodoacetate and punctual lidocaine (MIA-L) groups and 0.9 % NaCl for the sham group). The MIA-L group also received an intra-articular injection of lidocaine in the right knee on days 7, 14 and 21, 25 minutes before the PTAE. *SD* standard deviation

The PWT was lower after the MIA injection on days 3, 7, 14 and 21. This was also the case for the sham group on days 7 and 14. In the MIA-L group, the nadir in PWT was observed on day 3, whereas a significant increase was observed on day 7 and 14. There was a difference between MIA and MIA-L on days 7 ( $adj-P = 0.07$ ) and 14 ( $adj-P = 0.08$ ) (Figure 24).

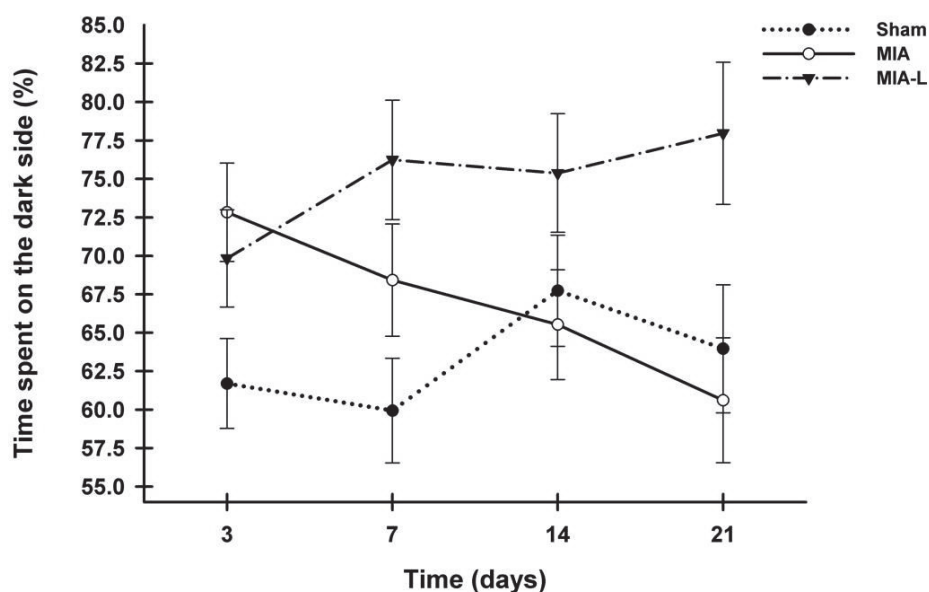


**Figure 24. Right hind paw (RHP) withdrawal threshold evolution after induction of osteoarthritis (least squares mean  $\pm$  standard error of the mean).**

On days 7 (adjusted *P* value ( $adj-P = 0.07$ )) and 14 ( $adj-P = 0.08$ ), the RHP paw withdrawal threshold was increased for the rats injected with monosodium iodoacetate and punctual lidocaine (MIA-L) when compared with rats injected with MIA.

### 2.3.5.2.3 Place escape/avoidance paradigm

Between-group analysis confirmed a significant treatment effect of lidocaine, in which MIA-L was different from MIA ( $P = 0.07$ ) and different from sham ( $P = 0.01$ ) (**Figure 25**). The group difference was particularly present for the two intermediate periods 2 and 3 of PEAP assessment previously observed as the most repeatable ones (see ‘Phase 1’).



**Figure 25. Place escape/avoidance paradigm (PEAP) evolution after osteoarthritis induction (least squares mean  $\pm$  standard error of the mean).**

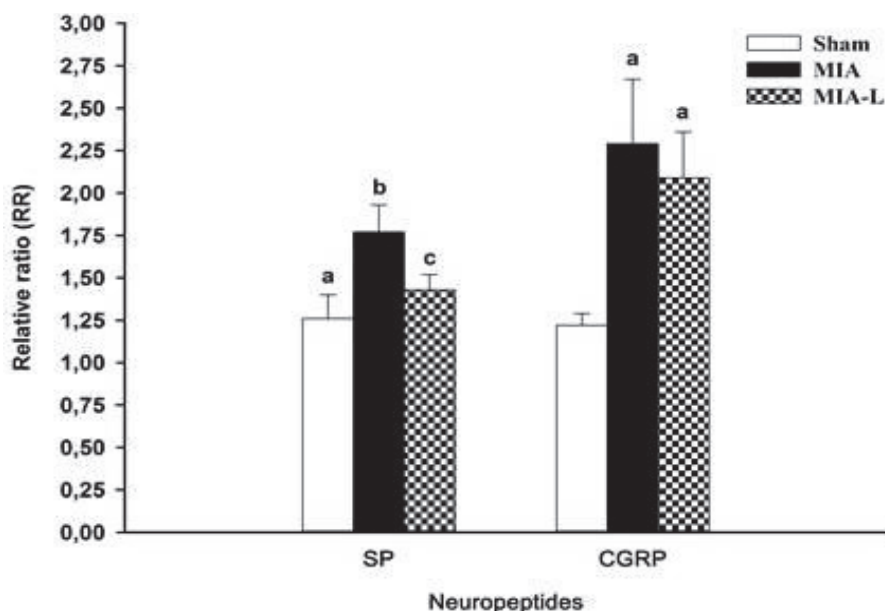
The percentage of time spent on the PEAP dark side was statistically higher in the lidocaine-treated rats with monosodium iodoacetate (*MIA-L*) when compared to the rats injected with monosodium iodoacetate (*MIA*) ( $P = 0.01$ ) and the sham group ( $P = 0.01$ ). Data presented here were collected for the whole period (20 minutes) at each day, but the observed between-group differences were the most obvious during the intermediate periods 2 (5-10 minutes) and 3 (10-15 minutes)

### 2.3.5.2.4 Treadmill

There was close similarity in the type of performance on the treadmill between the MIA-L and sham groups, in which their TNTC remained comparable to baseline values. Inversely, the TNTC in the MIA group decreased from day 7 onward. However, the observed between-group difference was not significant ( $P = 0.14$ ).

### 2.3.5.2.5 Neuropeptides

Mean relative ratio (RR) of neuropeptide concentrations of SP and CGRP 21 days after induction of OA are showed in **Figure 26**.



**Figure 26. Spinal substance P (SP) and calcitonin gene related-peptide (CGRP) concentrations.**

Spinal SP and CGRP concentrations 21 days after monosodium iodoacetate (MIA) injection (relative ratio (RR) mean and SD). Mean RR spinal cord concentration was normalized to the naive group. A RR of 1 indicated the concentration of normal rats from the naive group. The RR of SP and CGRP were increased in all groups (including the sham group) but had a higher peak after MIA injection. Lidocaine treatment (L) induced a lesser liberation of SP and CGRP (albeit not statistically significant for the latter) in the spinal cord of MIA-L group. <sup>a,b,c</sup> Significant inter-group statistical differences (adjusted  $P$  value < 0.10)

The absolute values of the concentration of neuropeptides have all been normalized in function of the naive group values and are shown as the RR. Compared to the naive group (**Tableau IX** and **Figure 26**) with a RR of 1, the SP concentrations were significantly increased in the MIA model (adj- $P$  = 0.016) with 2 mg of MIA (RR of  $1.77 \pm 0.16$ ) as in lidocaine treatment group (MIA-L) (RR of  $1.43 \pm 0.09$ ). The level of this peptide was statistically higher in the MIA group (adj- $P$  = 0.029) compared to the sham group injected with saline 0.9 % (RR ratio of  $1.26 \pm 0.14$ ). However, both the sham and MIA-L groups have significantly lower SP concentrations when compared to MIA group (adj- $P$  = 0.029). The concentration of CGRP was significantly increased in both MIA models (RR of  $2.29 \pm 0.39$  and  $2.09 \pm 0.29$  for MIA and MIA-L respectively). The sham group (RR of  $1.22 \pm 0.07$ ) had an increase too, in comparison

with the naive group ( $\text{adj-}P = 0.016$ ). On the other hand, both MIA groups had a statistically significantly higher level of CGRP than sham group ( $\text{adj-}P = 0.029$ ). When compared to MIA group, the MIA-L group had a statistically similar level of CGRP neuropeptide ( $\text{adj-}P=0.200$ ).

**Tableau XI. Neuropeptides inter-group comparisons in the monosodium iodoacetate osteoarthritis rat model.**

Inter-group comparisons	SP	CGRP
Three groups vs. naive rats	0.016*	0.016*
MIA vs. sham	0.029*	0.029*
MIA-L vs. sham	0.057*	0.029*
MIA-L vs. MIA	0.029*	0.200

MIA monosodium iodoacetate, *MIA-L* rats injected with monosodium iodoacetate and treated with punctual lidocaine injection, *SP* substance P, *CGRP* calcitonin gene related-peptide. \*Inter-group statistically significant difference (adjusted P value)

### 2.3.6 Discussion

Rat models are common in OA research as they are easy to customize and cost-effective (Gregory, Capito et al., 2012). The MIA model in particular can be standardized and is associated with rapidly developing well-characterized lesions (Lampropoulou-Adamidou, Lelovas et al., 2013; Marker and Pomonis 2012). In an effort to improve the translation of preclinical OA research to the clinical field, we conducted a two-phase study, first, to determine the most reliable pain assessment method protocol, and second, to validate this protocol in the most common chemical model of OA in rats with concomitant changes in spinal neuropeptide concentrations.

Initially, the effect of the environment (inverted circadian cycle, activity level [treadmill exercise] and observer) was tested using well-known pain assessment tools. Prior studies have demonstrated an effect of the inverted circadian cycle on pain research protocols with rodents (Jansen van't Land and Hendriksen 1995; John, Brown et al., 1994; Perissin, Facchin et al., 2000). Our results did not suggest any impact of conducting the evaluation during daytime

(more convenient for the investigator). Our group reported a significant reduction in variability of kinetics measures after exercise in cats (Moreau, Guillot et al., 2013) and dogs (Beraud, Moreau et al., 2010) with OA. The current study confirmed beneficial effects of exercise to reduce SWB (or other outcome) variability in the MIA rat model of OA. This study also qualified TNTC as a quantitative pain measure using spontaneous behavior. Importantly, the study tested reliability and validity of TNTC, and the potential impact on results obtained with other pain assessment methods, which may be used concurrently. Our results confirmed that a broad range of methods can be combined for pain assessment in the same animals while maintaining reliability and scientific validity.

Finally, as different observers can introduce some degree of bias in pain assessment outcomes, inter-rater reliability was tested by observers with different levels of expertise (one intermediate, one with advanced expertise). The methodology included in the current study was accessible to an observer with intermediate experience, as no significant difference was identified during analysis based on the level of experience. As a limitation, the number of observers was minimal, as both observers were women, and only objective assessment methods were selected for this study (limiting any bias related to subjective observation). Therefore, such a hypothesis (the potential influence of experience, and/or gender) would need to be tested further before making inferences from the results. This is particularly important, as recent works has established the observer's gender influence in inducing stress-related analgesia in rodents (Sorge, Martin et al., 2014). Similarly, for limiting the influence of interferential factors in the study of environment effect, only female rats were used. A possible gender effect would need to be tested in future experiments. Indeed, male rodents are recognized as more sensitive to olfactory exposure to males, including men, causing stress and related analgesia (Sorge, Martin et al., 2014). Moreover, sexual dimorphism has been observed in endogenous pain modulation mechanisms (Gaumond, Spooner et al., 2007), as well as hormonal influence on these mechanisms (Coulombe, Spooner et al., 2011; Liu, Li et al., 2014) Finally, women are more represented in the field chronic pain (Fillingim, King et al., 2009); however, many reasons are explored to investigate this finding (Mogil 2012). Also, since decades, male are overrepresented in preclinical research literature. This situation can definitely lead to a certain bias (Mogil and Chanda 2005). All these previous studies justify our decision to use female rats.

As a recognized indicator of test-retest reliability (Weir 2005), ICC demonstrated that assessment of mechanical sensitivity using Randall Selitto test presents poor repeatability, and this outcome cannot be recommended for a valid reflexive measure of pain. The phase 1 experiments demonstrated that SWB and tactile sensitivity can produce more repeatable data when animals (and the observer) are allowed to acclimate to the test device for at least one week. Similarly, there was a slight reduction in the variability of SWB when measured after treadmill exercise. However, the beneficial effects were not as significant in the chemically induced OA rat model as those observed in cats with naturally occurring OA (Guillot, Moreau et al., 2013; Moreau, Guillot et al., 2013). The PEAP, rotarod and treadmill activity measured as TNTC appeared to be highly repeatable without requiring prolonged acclimatization. It must be noted that in both treadmill and PEAP, the intermediate periods 2 and 3 (*i.e.* 5-10, and 10-15 min, respectively) demonstrated the highest repeatability. These results also suggest that the treadmill and PEAP session are a little too long, so for future experimentation the session could be reduced in both cases to 15 minutes instead of 20 minutes. To our knowledge, this study is the first to evaluate the test-retest (repeatability) and inter-rater (reproducibility) reliability of a complete set of pain assessment methods in normal rodents.

As a measure of distribution dispersion that does not require similar units and therefore allows comparison of different variables, the CV of each pain assessment method was verified. At the first evaluation, we again observed the poor metrological property of mechanical sensitivity, presenting the highest inter-individual variability (around 70 % CV). Moreover, the different acclimatization protocols did not help to decrease this variability as the variation in CV from the last to the first evaluation was between 0.53 and 1.07. On the other side, our results support the importance of choosing the optimal acclimatization protocol for pain assessment in the rat model. To our knowledge, this study represents the first systematic evaluation of the effect on data variability of different acclimatization protocols, four to eight assessments over 2-week period, with a series of tests near or far from others. The most reliable acclimatization protocol included five assessments with exposure to the testing methods every other day for the last week (days -14, -7, -5, -3, and -1), with baseline values acquired at day -1.

The second exploratory phase of our project evaluated the validity of the most promising pain assessment methods as determined during phase 1, when applied to the MIA model of OA in rats. Briefly, SWB, PTAE, PEAP and TNTC detected pain related changes following OA



induction with an intra-articular MIA injection and were validated by increased release of spinal neuropeptides such as SP and CGRP. However, the rotarod assessment, as used in our experimental conditions, was not sensitive to induction of OA pain. Moreover, the PTAE and PEAP methods demonstrated that the sham injection of 0.9 % NaCl was not totally neutral, which was confirmed by the augmentation of spinal liberation of SP (26 times higher) and CGRP (22 times higher) in the sham group. Interestingly, PTAE and PEAP also confirmed the analgesic effect of intra-articular lidocaine injection by the down-regulation of spinal neuropeptides, whereas TNTC and SWB did not detect the expected analgesic effect. These results suggest that SWB detects more biomechanical alterations of the joint than ongoing pain and consequently, could be a sensitive method to detect joint knee dysfunction. Of the four pain assessment methods evaluated for concurrent validity, only PEAP detected a treatment effect of lidocaine with a significant difference between the MIA-L group and both sham and MIA groups. Interestingly, body weight was not affected, either by possible manipulations-related stress in phase 1, and MIA pain induction in phase 2. This confirms the possible lack of sensitivity of different endpoints used in research, such as feeding, drinking, *etc.*, for determining quality of life.

The enhanced escape/avoidance behavior and lower PWT were previously demonstrated in both neuropathic and inflammatory pain models (Baastrup, Jensen et al., 2011; Boyce-Rustay, Zhong et al., 2010; LaBuda and Fuchs 2000; LaGraize, Labuda et al., 2004; Pedersen and Blackburn-Munro 2006). The higher sensitivity of PEAP compared to PTAE in detecting the efficacy of pain relief was also demonstrated in other studies (Boyce-Rustay, Zhong et al., 2010).

It would be logical to consider that animals would allocate roughly a similar amount of time in both environments if they do not show natural preference or aversion to one of the two environments in the PEAP testing. This study clearly establishes a strong preference of rat, a nocturnal animal, to the dark side of the test apparatus. The acclimatization of rats to the test apparatus is fast, the establishment of a baseline is preferable, and both intermediate periods 2 and 3 are highly repeatable. Moreover, PEAP assessment includes both classical (Pavlovian) and operant conditioning in the process of training (Li 2013). When compared with PEAP, PTAE required a longer acclimatization period for both the animal and the observer (at least one week as demonstrated in this study). However, assessing the escape/avoidance behavior



using the PEAP required a much longer evaluation time (with 20 to 30 minutes required for each animal), being too labor-intensive to the experimenters, while no automated apparatus is commercially available for this test.

Interestingly, the intra-articular lidocaine injection affected both PTAE and PEAP, and to a lesser degree TNTC, but did not alter changes in weight bearing of the RHP. The lack of effect of lidocaine on SWB could be related to a reduced pain in the absence of movement in this model. In a recent study (Okun, Liu et al., 2012), intra-articular lidocaine (200  $\mu$ L) was efficient to reduce the shift in weight bearing at day 14 post-MIA injection, but only for the highest dose of MIA (4.8 mg) injected. The lower MIA dose and volume in our study (2 mg and 50  $\mu$ L) combined with the lower sensitivity of SWB may be responsible for the lack of effect with this method, while PEAP and PTAE accurately captured expected pharmacological effects of lidocaine. Intra-articular lidocaine was chosen as analgesic test in this study, because of the apparently controversial results obtained in conditioning procedures with non-steroidal anti-inflammatory and opioid drugs (for review, see (Li 2013)). These findings may be useful when designing studies of the efficacy of analgesia using the MIA-induced OA rat model. Moreover, there is also some evidence that the combination of the quick-acting effect of lidocaine (reaching a peak effect at 10 minutes after the intra-articular on a CatWalk) (Ferreira-Gomes, Adaes, Mendonca et al., 2012) and the necessary time to induce a change in the distribution of gait in supraspinal locomotor areas patient OA (Jahn, Deutschlander et al., 2008), seems to explain the lack of detection of lidocaine analgesia by SWB. Previous studies combined with our results, provided evidence for future use of a continuous infusion of lidocaine to obtain a more sustained analgesic effect, attaining higher lidocaine synovial levels for a prolonged time period.

The intra-articular injection of saline (sham group) generated some hyperalgesia or allodynia, as assessed by PTAE and reflected by the observed change in the operant testing. This is supported by the recent finding of some increased NF- $\kappa$ B activity on days 3 and 7 measured by *in vivo* luminescent imaging in a transgenic mouse model receiving an intra-articular injection of saline (Bowles, Mata et al., 2013). Moreover, in the MIA mouse model tested in the same study, temporal kinetics of NF- $\kappa$ B activity were strongly correlated with mechanical allodynia (PTAE) and serum interleukin (IL)-6 levels in the inflammatory phase (day 3) of this model, while serum IL-1 $\beta$  was strongly correlated with pain sensitivity in the

chronic pain phase (up to day 28) (Bowles, Mata et al., 2013). An increase in the intra-articular pressure and possible injection-related inflammation are proposed to explain this finding. Based on these results, a neutral control group (without intra-articular injection) may be valuable in future experiments.

The MIA model is recognized as valuable in OA research for its ability to detect analgesic effects of different drugs and compounds. The initial inflammatory phase of this model allows the evaluation of various non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase inhibitors (Bove, Calcaterra et al., 2003; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012; Pomonis, Boulet et al., 2005). Moreover, the efficacy of morphine, gabapentin, pregabalin, and transient receptor potential vanilloid receptor antagonist was successfully demonstrated in this model (Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Ferreira-Gomes, Adaes, Sousa et al., 2012; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012). Moreover, some studies showed that MIA-induced OA leads to an increase in neurons firing rate and reduced activation threshold of afferent nerve fibers (Schuelert and McDougall 2006), which consequently leads to sensitization of spinal neurons in the dorsal horn (Harvey and Dickenson 2009). In this study, spinal cord neuropeptides quantification suggests and supports a development of central sensitization in this model. Indeed, our study confirms an increase in spinal biomarkers for SP and CGRP, as previously observed in the MIA model (Ferland, Pailleux et al., 2011).

The upregulation of spinal neuropeptides observed in this study suggests activation of the peptidergic afferent C-fibers, resulting in central sensitization. It has been well-demonstrated (Im, Kim et al., 2010), by relative increasing expression of target gene mRNA like pro-inflammatory cytokines (IL-1 and tumor necrosis factor) and pain mediators (CGRP, SP, neuropeptide Y, and galanin), that MIA-induced joint degeneration in rats generates an animal model suitable for mechanistic and pharmacologic studies on nociceptive pain pathways caused by OA. Altogether, this provides further key *in vivo* evidence that OA pain could be caused by central sensitization through communication between peripheral OA nociceptors and the central sensory system (Zhang, Ren et al., 2013; Abaei, Sagar et al., 2016). Despite the fact that SWB did not detect lidocaine treatment on day 21, or asymmetry of weight distribution, our study clearly demonstrated that lidocaine analgesic effects noted by PEAP were translated by concomitant significant down-regulation of spinal SP, which was 34 times lower, and of

CGRP, which was 20 times lower on day 21.

These results mimic similar therapeutic effects on behaviour and SP and CGRP spinal cord expression of intra-articular resiniferatoxin (Kim, Kim et al., 2016) and proteasome inhibitor MG132 (Ahmed, Li et al., 2012) in the MIA OA pain model in rats. Unfortunately, we observed that the MIA model caused temporary changes of short duration (return to baseline values at day 21 post injection) and relies on a disease mechanism (chemical inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in chondrocytes, resulting in cell death following the disruption of its cellular glycolysis process (Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997) that differs from human natural OA, which could limit the predictability of therapeutic effect of analgesic and disease-modifying agents. Finally, higher level of spinal neuropeptides at sacrifice clearly confirms that our model caused some long-term pain or OA damage.

### **2.3.7 Conclusion**

Pain assessment methods used with the MIA model should be selected and scheduled appropriately. From this study, only mechanical sensitivity presented had poor metrological properties, but SWB, the operant PEAP testing, tactile sensitivity, rotarod, and treadmill (TNTC) were repeatable under different environmental conditions. The rotarod test did not achieve sufficient sensitivity to detect OA pain induced by the MIA injection in rats and may not be included in future studies. For detecting the analgesic effect of local administration of lidocaine, the pain assessment method that demonstrated the best results was the operant testing, which had the greatest sensitivity, followed by PTAE, whereas SWB had some limitation in sensitivity. Spinal neuropeptide quantification at the end of the experimentation has allowed us to validate the effect of positive lidocaine treatment in a more objective manner, as MIA can induce pain. However, the main limitation of this study was the small sample size. Furthermore, it was possible to increase the validity and reliability of pain assessment methods with an optimal acclimatization protocol (fives assessment over 2 weeks). In addition, the sham intra-articular saline injection was not totally neutral, particularly with more sensitive methods such as PEAP, PTAE, and this was confirmed by the release of spinal neuropeptides. We therefore recommend the addition of a naive control group (without intra-articular injection). Moreover, increased neuropeptide levels obviously support the central sensitization observed in the MIA

rat model. The present results highlight potential for these neuromediators as pharmacological biomarkers for analgesic testing in association with sensitive functional assessment methods.

### **2.3.8 Acknowledgements**

The authors would like to address a special thank to Mrs. Virginia Wallis for editing the manuscript. The authors would like to thank ArthroLab Inc. and CiToxLAB North-America Inc. personnel for their contributions to this work.

### **2.3.9 Funding**

This study was partly supported by a Discovery grant (#327158-2008; #441651-2013; Eric Troncy) and a Collaborative Research and Development grant ((#418399-2011 with ArthroLab Inc.; Eric Troncy) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), supporting pain bio-analyses, by an ongoing New Opportunities Fund grant (#9483) and a Leader Opportunity Fund grant (#24601; Eric Troncy) from the Canada Foundation for Innovation, supporting pain equipment, as well as ArthroLab, Inc. and CiToxLAB North America, Inc. for their collaboration, access to animals, personnel and related facilities. This study was funded by a Pfizer Neuropathic Pain Research award (#WS386180; Eric Troncy) from Pfizer Canada, Inc.

### **2.3.10 Availability of data and supporting materials**

The datasets supporting the conclusions of the article are available in Papyrus repository [[www.bib.umontreal.ca/theses](http://www.bib.umontreal.ca/theses)].

### **2.3.11 Authors' contributions**

Each co-author has taken an active part in this project from the conception and design of the content (CO, JG, SA, JMP, JPP and ET), to the technical realization of manipulations (CO, JG, JAG, DG, CP, SA, MAD, PS and ET), analysis and interpretation of published data (CO, JG, MG and ET), drafting and revising of the article (all co-authors) with the final approval of the submitted version. Each of them completely agrees with the presented data, and believes that the manuscript represents honest work.

### **2.3.12 Authors' information**

This manuscript is part of the *PhD* thesis of CO. Several authors are recognized experts in the field of animal pain assessment (ET, FB), laboratory animal pain assessment (ET, PS, SA), rheumatology (JMP, JPP, ET) and others are their graduate students (CO, JG, MG, JAG, DG, CP, MAD).

### **2.3.13 Competing interests**

The authors declare that they have no competing interest.

### **2.3.14 Ethics approval and consent to participate**

During the study, care and use of animals were subject to and approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of Université de Montréal (#Rech-1495) and conducted in accordance with principles outlined in the current Guide to the Care and Use of Experimental Animals published by the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health.

### **2.3.15 References**

- Abaei M, Sagar DR, Stockley EG, et al. (2016) Neural correlates of hyperalgesia in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain. *Mol Pain* 12.
- Ahmed AS, Li J, Erlandsson-Harris H, et al. (2012) Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. *Pain* 153: 18-26.
- Allen KD, Mata BA, Gabr MA, et al. (2012) Kinematic and dynamic gait compensations resulting from knee instability in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 14: R78.
- Baastrop C, Jensen TS and Finnerup NB (2011) Pregabalin attenuates place escape/avoidance behavior in a rat model of spinal cord injury. *Brain Res* 1370: 129-35.
- Barrot M (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211: 39-50.

- Beaudry F, Ferland CE and Vachon P (2009) Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 23: 940-50.
- Beraud R, Moreau M and Lussier B (2010) Effect of exercise on kinetic gait analysis of dogs afflicted by osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 23: 87-92.
- Blackburn-Munro G (2004) Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends Pharmacol Sci* 25: 299-305.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, et al. (2003) Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 821-30.
- Bowles RD, Mata BA, Bell RD, et al. (2013) In Vivo luminescent imaging of NF-kappaB activity and serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*.
- Boyce-Rustay JM, Zhong C, Kohnken R, et al. (2010) Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology* 58: 537-43.
- Calza L, Pozza M, Zanni M, et al. (1998) Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 82: 575-89.
- Che FY and Fricker LD (2002) Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74: 3190-8.
- Combe R, Bramwell S and Field MJ (2004) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett* 370: 236-40.
- Coulombe MA, Spooner MF, Gaumond I, et al. (2011) Estrogen receptors beta and alpha have specific pro- and anti-nociceptive actions. *Neuroscience* 184: 172-82.
- Cruz-Almeida Y and Fillingim RB (2013) Can Quantitative Sensory Testing Move Us Closer to Mechanism-Based Pain Management? *Pain Medicine*: DOI: 10.1111/pme.12230.
- Curran-Everett D and Benos DJ (2004) Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R247-9.
- Dolgin E (2010) Animalgesic effects. *Nat Med* 16: 1237-40.

- Edwards RR, Sarlani E, Wesselmann U, et al. (2005) Quantitative assessment of experimental pain perception: multiple domains of clinical relevance. *Pain* 114: 315-9.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, et al. (2011) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45: 423-9.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. (2004) Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112: 83-93.
- Ferreira-Gomes J, Adaes S, Mendonca M, et al. (2012) Analgesic effects of lidocaine, morphine and diclofenac on movement-induced nociception, as assessed by the Knee-Bend and CatWalk tests in a rat model of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 101: 617-24.
- Ferreira-Gomes J, Adaes S, Sousa RM, et al. (2012) Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. *Mol Pain* 8: 50.
- Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, et al. (2009) Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain* 10: 447-85.
- Fuchs PN and McNabb CT (2012) The place escape/avoidance paradigm: a novel method to assess nociceptive processing. *J Integr Neurosci* 11: 61-72.
- Gaumond I, Spooner MF and Marchand S (2007) Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience* 146: 366-74.
- Gregory MH, Capito N, Kuroki K, et al. (2012) A review of translational animal models for knee osteoarthritis. *Arthritis* 2012: 764621.
- Guillot M, Moreau M, Heit M, et al. (2013) Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet J* 196: 360-7.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, et al. (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 40: 1670-9.
- Guzman RE, Evans MG, Bove S, et al. (2003) Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31: 619-24.



- Harvey VL and Dickenson AH (2009) Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain* 5: 18.
- Hootman JM and Helmick CG (2006) Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis Rheum* 54: 226-9.
- Im HJ, Kim JS, Li X, et al. (2010) Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis and Rheumatism* 62: 2995-3005.
- Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, et al. (2007) Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128: 272-82.
- Jahn K, Deutschlander A, Stephan T, et al. (2008) Supraspinal locomotor control in quadrupeds and humans. *Prog Brain Res* 171: 353-62.
- Jansen van't Land C and Hendriksen CF (1995) Change in locomotor activity pattern in mice: a model for recognition of distress? *Lab Anim* 29: 286-93.
- John TM, Brown MC, Wideman L, et al. (1994) Melatonin replacement nullifies the effect of light-induced functional pinealectomy on nociceptive rhythm in the rat. *Physiol Behav* 55: 735-9.
- Kelly S, Dunham JP, Murray F, et al. (2012) Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive primary afferent neurones during MIA-induced osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 305-13.
- Kim Y, Kim EH, Lee KS, et al. (2016) The effects of intra-articular resiniferatoxin on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 20: 129-36.
- King, Devine DP, Vierck CJ, et al. (2003) Differential effects of stress on escape and reflex responses to nociceptive thermal stimuli in the rat. *Brain Res* 987: 214-22.
- Kissin I (2010) The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesth Analg* 110: 780-9.
- Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, et al. (2003) Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci* 65: 1195-9.



- LaBuda CJ and Fuchs PN (2000) A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp Neurol* 163: 490-4.
- LaGraize SC, Labuda CJ, Rutledge MA, et al. (2004) Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 188: 139-48.
- Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, et al. (2013) Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*.
- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. (2008) Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58: 26-35.
- Levine JD, Collier DH, Basbaum AI, et al. (1985) Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 12: 406-11.
- Li JX (2013) The application of conditioning paradigms in the measurement of pain. *Eur J Pharmacol* 716: 158-68.
- Little CB and Hunter DJ (2013) Post-traumatic osteoarthritis: from mouse models to clinical trials. *Nat Rev Rheumatol* 9: 485-97.
- Liu P, Okun A, Ren J, et al. (2011) Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. *Neurosci Lett* 493: 72-5.
- Liu X, Li W, Dai L, et al. (2014) Early repeated administration of progesterone improves the recovery of neuropathic pain and modulates spinal 18kDa-translocator protein (TSPO) expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143: 130-40.
- Mao J (2009) Translational pain research: achievements and challenges. *J Pain* 10: 1001-11.
- Marker CL and Pomonis JD (2012) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol Biol* 851: 239-48.
- Mauderli AP, Acosta-Rua A and Vierck CJ (2000) An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods* 97: 19-29.
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10: 283-94.
- Mogil JS (2012) Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci* 13: 859-66.

- Mogil JS and Chanda ML (2005) The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* 117: 1-5.
- Mogil JS and Crager SE (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112: 12-5.
- Moreau M, Guillot M, Pelletier JP, et al. (2013) Kinetic peak vertical force measurement in cats afflicted by coxarthrosis: data management and acquisition protocols. *Res Vet Sci* 95: 219-24.
- Moreau M, Pelletier JP, Lussier B, et al. (2013) A Posteriori Comparison of Natural and Surgical Destabilization Models of Canine Osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013: 180453.
- Nagase H, Kumakura S and Shimada K (2012) Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65: 29-36.
- Navratilova E, Xie JY, King T, et al. (2013) Evaluation of reward from pain relief. *Ann N Y Acad Sci* 1282: 1-11.
- Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, et al. (2006) Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 507-14.
- Okun A, Liu P, Davis P, et al. (2012) Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain* 153: 924-33.
- Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, et al. (2011) Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 134.
- Palmer AM and Sundstrom L (2013) Translational medicines research. *Drug Discov Today* 18: 503-5.
- Pedersen LH and Blackburn-Munro G (2006) Pharmacological characterisation of place escape/avoidance behaviour in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)* 185: 208-17.
- Perissin L, Facchin P and Porro CA (2000) Diurnal variations in tonic pain reactions in mice. *Life Sci* 67: 1477-88.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114: 339-46.

- Schuelert N and McDougall JJ (2006) Electrophysiological evidence that the vasoactive intestinal peptide receptor antagonist VIP6-28 reduces nociception in an animal model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 14: 1155-62.
- Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, et al. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11: 629-32.
- Suokas AK, Walsh DA, McWilliams DF, et al. (2012) Quantitative sensory testing in painful osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1075-85.
- Thakur M, Rahman W, Hobbs C, et al. (2012) Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One* 7: e33730.
- Vierck, Acosta-Rua A, Nelligan R, et al. (2002) Low dose systemic morphine attenuates operant escape but facilitates innate reflex responses to thermal stimulation. *J Pain* 3: 309-19.
- Vierck, Hansson PT and Yeziarski RP (2008) Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain* 135: 7-10.
- Vierck, Kline RH and Wiley RG (2003) Intrathecal substance p-saporin attenuates operant escape from nociceptive thermal stimuli. *Neuroscience* 119: 223-32.
- Vierck, Kline Rt and Wiley RG (2004) Comparison of operant escape and innate reflex responses to nociceptive skin temperatures produced by heat and cold stimulation of rats. *Behav Neurosci* 118: 627-35.
- Vonsy JL, Ghandehari J and Dickenson AH (2009) Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. *Eur J Pain* 13: 786-93.
- Weir JP (2005) Quantifying test-retest reliability using the intraclass correlation coefficient and the SEM. *J Strength Cond Res* 19: 231-40.
- Woolf CJ (1996) Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* 66: 105-8.
- Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier MJ, et al. (2009) Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain* 10: 767-73.
- Yeziarski RP and Vierck CJ (2011) Should the hot-plate test be reincarnated? *J Pain* 12: 936-7; author reply 38-9.

Zhang RX, Ren K and Dubner R (2013) Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1308-15.

Zhang XJ, Zhang TW, Hu SJ, et al. (2011) Behavioral assessments of the aversive quality of pain in animals. *Neurosci Bull* 27: 61-7.

## **2.4 Spinal neuropeptide modulation, functional assessment and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis**

Cet article, publié dans *Neuropeptides*, a permis de caractériser les changements dans le temps des mesures (subjectives et objectives) de la douleur et des lésions du cartilage suite à une induction chimique de l'arthrose chez le rat. Le but de cette étude était de caractériser la modulation de l'évolution temporelle de quatre différents neuropeptides spinaux (SP, CGRP, BK et STT) de la douleur liée à la sensibilisation centrale et de déterminer leur expression potentielle en tant que biomarqueurs de la douleur par rapport à l'évaluation fonctionnelle de la nociception et la sévérité des lésions cartilagineuses dans l'articulation ipsilatérale.

Les résultats de cette étude montrent que dans le modèle MIA de douleur arthrosique, la modulation des neuropeptides spinaux apparaît précocement et confirme que le SNC est une cible attrayante pour la quantification de la douleur liée à l'arthrose. La relation entre la libération des neuropeptides, la sévérité des lésions cartilagineuses et l'évaluation fonctionnelle de la douleur est une stratégie prometteuse, mais elle doit être validée davantage.

Mme Colombe Otis a participé à la conception du schéma expérimental, aux manipulations des rongeurs, à la réalisation des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur ainsi qu'aux mesures neuroprotéomiques, aux analyses macroscopiques des genoux, à l'acquisition et aux traitements des données et puis elle a assisté Dr Guillot pour les analyses statistiques de ces dernières. Pour la rédaction de cet article, Mme Otis était premier auteur et a donc participé activement à sa rédaction, à la recherche littéraire, à l'infographie de toutes les figures et tableaux de l'ensemble du manuscrit. Elle a également modifié et enrichi l'article suite aux commentaires par les réviseurs afin que ce manuscrit soit bonifié et re-soumis pour publication pour finalement être accepté pour publication.

Colombe Otis<sup>1,2</sup>, Martin Guillot<sup>1,2</sup>, Maxim Moreau<sup>1,2</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>2</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>2</sup>, Francis Beaudry<sup>1,2</sup>, Eric Troncy<sup>1,2</sup>

### **2.4.1 Abstract**

Characterising the temporal evolution of changes observed in pain functional assessment, spinal neuropeptides and cartilage lesions of the joint after chemical osteoarthritis (OA) induction in rats. On day (D) 0, OA was induced by an IA injection of monosodium iodoacetate (MIA). Rats receiving 2 mg MIA were temporally assessed at D3, D7, D14 and D21 for the total spinal cord concentration of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT), and for severity of cartilage lesions. At D21, the same outcomes were compared with the IA 1 mg MIA, IA 2 mg MIA associated with punctual IA injection of lidocaine at D7, D14 and D21, sham (sterile saline) and naïve groups. Tactile allodynia was sequentially assessed using a von Frey anaesthesiometer. Non-parametric and mixed models were applied for statistical analysis. Tactile allodynia developed in the 2 mg MIA group as soon as D3 and was maintained up to D21. Punctual IA treatment with lidocaine counteracted it at D7 and D14. Compared to naïve, [STT], [BK] and [CGRP] reached a maximum as early as D7, which plateaued up to D21. For [SP], the increase was delayed up to D14 and maintained at D21. No difference in levels of neuropeptides was observed between MIA doses, except for higher [STT] in the 2 mg MIA group ( $P = 0.029$ ). Neuropeptides SP and BK were responsive to lidocaine treatment. The increase in severity of cartilage lesions was significant only in the 2 mg MIA groups ( $P = 0.01$ ). In the MIA OA pain model, neuropeptide modulation appears early, and confirms the central nervous system to be an attractive target for

---

<sup>1</sup> Animal Pharmacology Research Group of Quebec (GREPAQ) – Department of veterinary biomedicine, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, St.-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada

<sup>2</sup> Osteoarthritis Research Unit, Université de Montréal Hospital Research Center (CRCHUM), Pavillon R, Montreal (QC), H2X 0A9 Canada

OA pain quantification. The relationship of neuropeptide release with severity of cartilage lesions and functional assessment are promising and need further validation.

### **2.4.2 Keywords**

Neuropeptidomics, Osteoarthritis, Animal preclinical model, Pain, Nociception

### **2.4.3 Introduction**

Osteoarthritis (OA) is a complex degenerative disease of the whole joint characterised by progressive loss of articular cartilage, sclerosis of the underlying subchondral bone, formation of osteophytes, synovial inflammation, and loss of normal joint function (Loeser and Treede 2008; Loeser, Goldring et al., 2012). As a major OA symptom, pain often combines hyper-sensitivity and continuous pain at rest, and generally involves the processes of both peripheral and central sensitisation. The joint capsule, subchondral bone, periosteum, synovium and ligaments are deeply innervated and could be an important source of nociceptive input in OA (Kidd, Mapp et al., 1990). The interaction of inflammatory cytokines within stifle joint afferents and the regulation of the transcription nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activity have been well documented (Bowles, Mata et al., 2014).

Central sensitisation mechanisms include various biochemical processes such as increased spinal release of neuro-transmitters/-modulators and accentuated (in time and intensity) excitability of postsynaptic neurons (Woolf 1996). There is expanding indication that the cartilage destruction in OA is the result of multiple biochemical activities implicating cytokines, inflammatory mediators and enzymes, with a close intrication to nociceptive stimulation and sensitisation, for which targeting peptide receptors offer new attractive therapeutic strategies for OA pain (Malfait and Miller 2016). In pain transmission, peptidergic neurons and central neuronal synapses involve neuropeptides expression (Malavolta and Cabral 2011). For example in rodent spinal cord, tachykinin such as substance P (SP) (Saidi, Kamali et al., 2016), calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Le Greves, Andersson et al., 1997) and somatostatin (STT) (Prasoon, Kumar et al., 2015) are well recognised to participate in the modulation of central pain sensitisation (Latremoliere and Woolf 2009). Moreover, the peptide bradykinin (BK) is also known to potentiate synaptic transmission in pain hypersensitivity

(Kohno, Wang et al., 2008). However, the contribution of such spinal neuro-mediators in OA chronic pain establishment has been poorly described.

Recently, the reliability and concurrent validity of different pain assessment methods were tested in a chemically-induced OA model in rats (Otis, Gervais et al., 2016). Interestingly, the behavioural responses, being semi-subjective, were validated in comparison to objective pain neuropeptidomic measurements that were sensitive to chemical OA induction as well as to analgesic treatment responsiveness.

The chemical monosodium iodoacetate (MIA) OA model is considered a standard OA model for pain assessment. Injection of the irreversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor into the stifle (equivalent to the human knee) joint space reproduces cartilage lesions similar to human OA (Marker and Pomonis 2012) in a dose-dependent manner (Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Janusz, Hookfin et al., 2001). In parallel to degenerative changes within the joint in the inflammatory early (first 7 days) phase, a second pain phenotype rapidly progresses in the ipsilateral hind limb, less sensible to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Ivanavicius, Ball et al., 2007). However, blocking the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, with systemic antagonists, attenuated OA pain behaviour (Kelly, Chapman et al., 2015), suggesting the presence of peripheral/central sensitisation (Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997). Lidocaine is widely used for regional anaesthesia in order to block impulses in peripheral nerves by inhibiting voltage-gated sodium channels (Catterall 2000). Many other mechanisms regarding the site of action have been proposed for lidocaine in nerve fibers, such as interaction with membrane receptors, proteins, phospholipids, modulation of multiple calcium and potassium channels and kinases (Zhang, Tanabe et al., 2014). Use of intra-articular (IA) local anaesthetic as analgesic presents the advantage of avoiding false positives to behavioural assessment from drugs (such as systemic opioids and gabapentinoids) that cause motor impairment or sedative effects. The involvement of IA lidocaine injection in a MIA OA model with simultaneous spinal neuropeptide regulation remained relevant to understand mechanism underlying OA progression.

Our hypothesis is that the modulation of spinal neuropeptides in the MIA OA model can be detected, quantified and related with the extent of behavioural functional assessment, and of cartilage lesions in the affected stifle with or without lidocaine treatment. Consequently, over a period of 21 days (D) and with temporal sacrifice, the aim of this prospective, randomised,



blinded and controlled study was to characterise the modulation of four different spinal pain neuropeptides (SP, CGRP, BK and STT) and to determine their potential expression as biomarkers of pain in comparison with the functional assessment of nociception, and the severity of cartilage lesions in the ipsilateral stifle joint.

## **2.4.4 Materials and methods**

### **2.4.4.1 Animals and induction of OA**

Procedures were carried out in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CIPA #H11005ETr). A total of 61 female Sprague-Dawley rats (230-250 g) (Charles River Laboratories International, Inc., Saint-Constant, QC, Canada) were housed in groups of four, with food and water *ad libitum*, and kept at a constant temperature of 22°C in a 12-hour light-dark cycle. At day (D) 0, rats were mask-anaesthetised with 2 % isoflurane in O<sub>2</sub> to receive a single blinded IA MIA injection through the infrapatellar ligament of the right stifle as previously described (Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997). Rats were randomly distributed in groups of  $n = 8$ : (1) MIA (Sigma-Aldrich, Inc., St-Louis, MO, USA) at a dose of 1 mg (sacrifice at D21); (2 to 5) MIA 2 mg ( $n = 32$ , with progressive sacrifice of 8 rats at each time point: D3, D7, D14 and D21); (6) MIA 2 mg with a punctual lidocaine (L) injection (2 mg MIA-L group) in the right stifle on days 7, 14 and 21 post-MIA injection, 25 minutes before functional assessment. Rats from the 2 mg MIA-L group were again similarly mask-anaesthetised with a single IA injection of lidocaine through the infrapatellar ligament of the right stifle. Lidocaine Neat® (2 %, Zoetis Canada, Kirkland, QC, Canada) was injected at a volume of 50 µL using a 26-gauge, 0.5-inch needle mounted on a 0.5-mL syringe; (7) 0.9 % sterile saline (50 µL) for a sham group; in addition an eighth group ( $n = 5$ ) of naïve rats were kept in the same conditions and sacrificed at the end of the experiments. All MIA doses were dissolved in 50 µL of 0.9 % sterile saline.

### **2.4.4.2 Functional assessment of nociception**

Testing was performed during the daylight phase. All animals were allowed to acclimate to testing conditions according to an acclimation protocol using five occurrences of exposure

over 2 weeks before the OA induction, as previously published (Otis, Gervais et al., 2016). Functional assessments were performed at one day before OA induction for baseline values, and at D3, D7, D14 and D21 post-induction.

#### *2.4.4.2.1 Sensory-reflexive evaluation*

Tactile sensitivity was assessed using an Electronic von Frey Anesthesiometer® (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) applied to the plantar surface of the hind paw, and by measuring the paw withdrawal threshold to von Frey ascending mechanical stimuli as previously described (Otis, Gervais et al., 2016). Gradually increasing pressure was applied with a mechanical von Frey polypropylene probe (0.7 mm<sup>2</sup>, Rigid Tip®, IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) fitted to a handheld force transducer. The stimulus was continued until the hind paw was withdrawn and considered indicative of the paw withdrawal threshold (PWT). For each animal, triplicates of each hind paw were taken with a 60-s interval between each stimulus.

#### **2.4.4.3 Proteomic analysis**

##### *2.4.4.3.1 Spinal cord sample preparation*

Rat spinal cords were rapidly collected at sacrifice; snap frozen and homogenised as previously published (Otis, Gervais et al., 2016). Briefly, at the end of each experimentation day, the entire spinal cord tissue of rats was rapidly collected by a flush of saline within the lumbar spinal canal following deep anaesthesia with isoflurane and sacrifice by transection of the cervical spine. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C pending analysis. Each spinal cord was weighed accurately and homogenised using a tissue tear and following the addition of phosphate-buffered saline solution (PBS) 0.01 M at a ratio of 1:5 (w/v) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, ON, Canada, number PP8340) at the same ratio (v/v). The samples were then sonicated and the homogenate was mixed with acetonitrile at a ratio of 1:1 (v/v) to remove larger proteins. The samples were vortexed and centrifuged for 10 minutes (×12,000 g) and the supernatant was transferred into an injection vial then spiked with the internal standard solution at a ratio of 1:1 (v/v). The spinal cords from the naïve group were also collected to obtain a baseline value from normal rats to normalise values obtained from the 1 or 2 mg MIA, 2 mg MIA-L, and sham groups.

#### 2.4.4.3.2 *Neuropeptidomic analysis*

Neuropeptide quantification in spinal cord homogenate was achieved by high-resolution accurate mass spectrometry (*i.e.* hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer) coupled with a high performance liquid chromatography system. Data were acquired and analysed as previously described (Otis, Gervais et al., 2016). Formic acid, trifluoroacetic acid and ammonium bicarbonate were obtained from Sigma Aldrich, Inc. (Saint-Louis, MO, USA). The standards for SP, CGRP, BK and STT were purchased from Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Belmont, CA, USA). Deuterium labelled analogue peptides were synthesised *de novo* (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada). Peptides were quantified using an isotonic dilution strategy. Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific, Inc. (NJ, USA), and ammonium hydroxide 28.0-30.0 % were purchased from J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, USA).

#### 2.4.4.4 **Assessment of cartilage lesions**

At the end of each sacrifice, right stifle joints were collected, dissected free of muscle and fixed in a 10 % formaldehyde solution until macroscopic evaluation. Following fixation, stifle joints were dissected to access to the severity of the cartilage alterations of the femoral condyle and tibial plateau and then stained in a solution of 0.125 % (w/v) Evans blue (No E2129; Sigma-Aldrich, Inc., Oakville, ON, Canada) dissolved in 0.9 % saline. An image of each area without any magnification was captured using a reflex camera (Nikon D7000 equipped with a Nikon AF-S Micro Nikkor 60 mm f/2.8G ED, Nikon Canada Inc.) for future scoring. Three blinded observers separately graded the condyle and tibial plateau of the stifle joint (the medial and lateral femoral condyles, the medial and lateral tibial plateaus) for macroscopic cartilage lesions using a Likert scale from 0-4 (0=normal; 4=maximum severity) (Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997). After scoring, a consensus was obtained between observers by majority, and the 4 compartment scores were summed for a maximum global score of 16.

#### 2.4.4.5 **Statistical analysis**

All statistical analyses were achieved with a statistical software program (SAS system for Windows, version 9.2, Cary, NC, USA) with an alpha value set at 0.05. Non-parametric and mixed models were applied. Based on a power calculation (G \* Power 3.1.9.2) from a previous

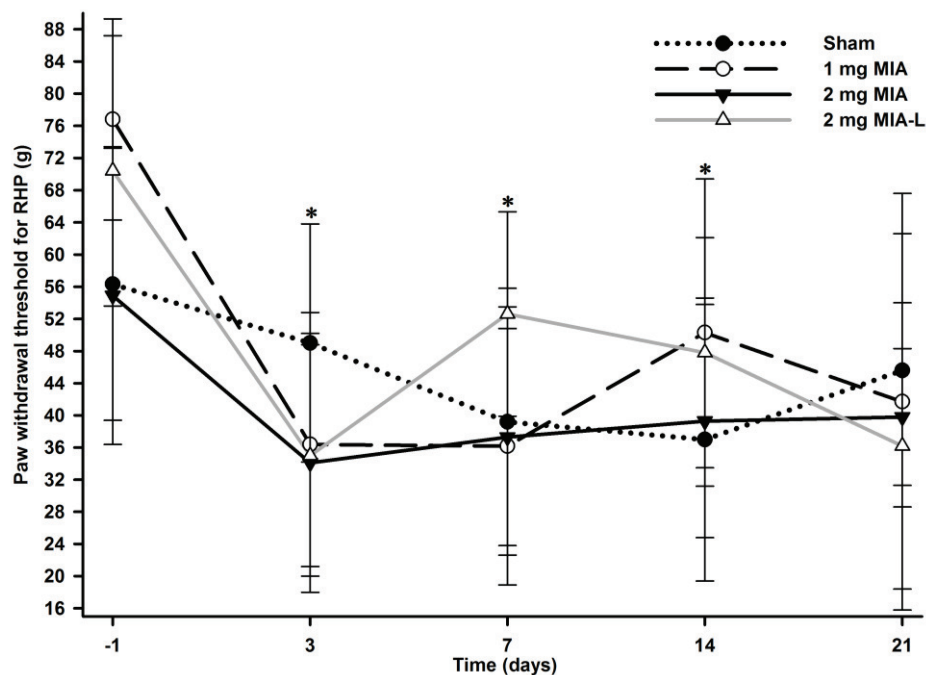
publication (Otis, Gervais et al., 2016) with  $\alpha = 0.05$ , power = 0.80, expected intergroup mean  $\pm$  SD difference in spinal neuropeptides varying minimally at  $0.22 \pm 0.07$ , the sample size required was estimated to be  $n = 6-8$  per group. Briefly, the sensory-reflexive evaluation data were expressed as the average obtained from the three trials on the RHP. A cut-off of 100 g was attributed to minimise the variability. Data were then analysed using mixed models for repeated measures. Treatment groups and day were considered as fixed effects and animals in groups as random effects. Models accounted for baseline measurement using the baseline as a covariate. For each model, the best structure of the covariance model was assessed using a graphical method (plots of covariance *versus* lag in time between pairs of observations compared to different covariance models), and using information criteria that measure the relative fit of competing covariance models. When multiple comparisons were carried out, the Tukey-Kramer adjustment was used to obtain adjusted (adj)- $P$  value, using a one-sided hypothesis of difference compared to 2 mg MIA group, two-sided otherwise. Neuropeptide quantification was analysed using the Man-Whitney-Wilcoxon rank-sum test following a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. For macroscopic cartilage evaluation, total scores were analysed with a generalised linear model for Poisson distributed data. Multiple comparisons of group's effect were performed using a Dunnett's two-tailed  $t$ -test, leading to adj- $P$  values.

## 2.4.5 Results

### 2.4.5.1 Functional assessment of nociception: sensory-reflexive evaluation

Compared to baseline, the right hind paw (IA injected) PWT was lower in all MIA groups at D3 (adj- $P < 0.05$ ) and the decrease was maintained in the 2 mg MIA group up to D21 (**Figure 27**). The induced tactile allodynia was not so sustained with the 1 mg MIA group, demonstrating no statistically significant difference at D14, and D21, compared to baseline. The saline injection in the right stifle of the sham group was traduced in statistically significant decreased PWT at D7 and D14 (adj- $P < 0.05$ ). Significant intergroup difference was observed at D3 for PWT between the 2 mg MIA and sham groups (adj- $P = 0.01$ ), as well as the 2 mg MIA-L and sham groups (adj- $P = 0.03$ ). At D7 and D14, after the IA lidocaine injection, the 2 mg MIA-L PWT was higher (adj- $P = 0.001$ , and 0.04, respectively) when compared to their D3 values. Punctual IA lidocaine injection also caused a higher PWT with an intergroup difference

between the 2 mg MIA and 2 mg MIA-L groups at D7 ( $\text{adj-}P = 0.03$ ) and D14 ( $\text{adj-}P = 0.04$ ). No significant intergroup difference was noted at D21, indicating particularly an absence of analgesic treatment for the IA injection of lidocaine.



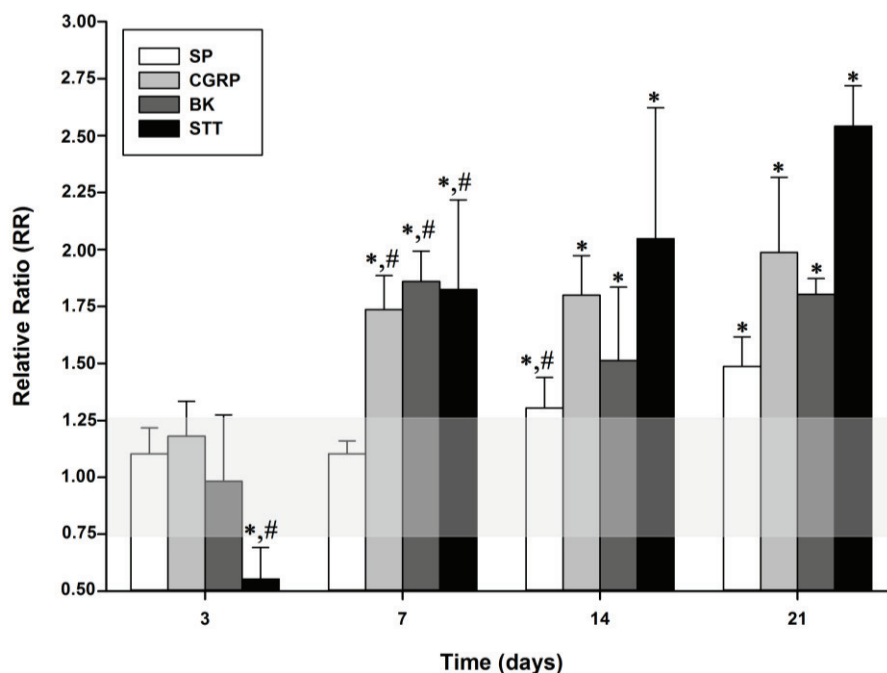
**Figure 27. Right hind paw (RHP) withdrawal threshold (PWT) of the sensory-reflexive evaluation.**

Mean and standard deviation of the right hind paw (RHP) withdrawal threshold (PWT) of the sensory-reflexive evaluation by experimental group over days after induction of osteoarthritis. On day (D) 3, the PWT of OA rats with 2 mg MIA was decreased compared to sham group ( $\text{adj-}P = 0.01$ ), as well as between the 2 mg MIA-L and sham groups ( $\text{adj-}P = 0.03$ ). Punctual lidocaine injection in 2 mg MIA rats (2 mg MIA-L) showed a statistically significant increase of the RHP PWT compared with 2 mg MIA rats without intra-articular treatment at D7 ( $\text{adj-}P = 0.03$ ) and D14 ( $\text{adj-}P = 0.04$ ). No significant intergroup difference was noted at D14 and D21. \*Inter-group significant difference at each day ( $\text{adj-}P < 0.05$ ) (see text for details).

#### 2.4.5.2 Temporal evolution of neuropeptides

Progressive sacrifice at D3, D7, D14 and D21 of rats after injection of 2 mg MIA resulted in two different profiles for the spinal neuropeptides measured. **Figure 28** shows the relative ratio (RR) of neuropeptide concentration normalised by respective naïve group concentrations. An increase close to maximum was noted as early as D7 ( $\text{adj-}P < 0.031$ ) for CGRP, BK and STT. The observed increase was maintained up to D21. Of note, at D3 the [STT] was lower (RR of  $0.55 \pm 0.14$ ) compared to the naïve group ( $\text{adj-}P = 0.007$ ). On the other hand, the up-

regulation was slightly delayed, at D14, for SP, showing a difference ( $\text{adj-}P = 0.041$ ) between D7 (RR of  $1.10 \pm 0.06$ ) and D14 ( $1.30 \pm 0.13$ ) that was maintained until D21 (RR of  $1.49 \pm 0.13$ ). Descriptive statistics of the spinal temporal concentration of the four neuropeptides without normalisation are provided in **Tableau XII**.



**Figure 28. Mean relative ratio (normalised with naïve group) of spinal temporal concentrations  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) at day (D) 3, D7, D14 and D21 post induction of osteoarthritis (OA) by 2 mg of monosodium iodoacetate (MIA).**

A relative ratio of 1 indicates the concentration in normal rats and is represented by the horizontal gray zone ( $1.00 \pm 0.26$ ). Compared to naïve neuropeptides, only the [STT] was decreased at D3. The temporal evolution of neuropeptides demonstrated an up-regulation that reached a maximum as early as D7 for CGRP, BK and STT, a level that was sustained up to D21. For the [SP], the increase was delayed up to D14 and was maintained at D21. \* Significant difference compared to naïve group ( $\text{adj-}P < 0.05$ ). # Previous day significant difference ( $\text{adj-}P < 0.05$ ) (*i.e.*, D3 compared to naïve group, D7 compared to D3, D14 compared to D7 and D21 compared to D14) to allow temporal evolution.

**Tableau XII. Spinal temporal concentration of neuropeptides.**

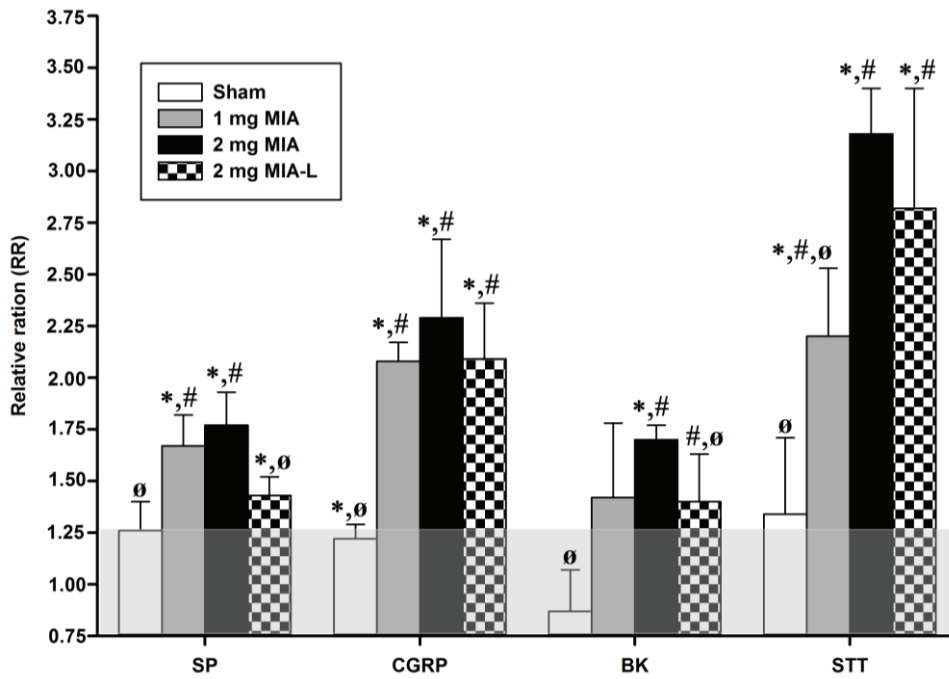
Neuropeptide (fmol/mg)	Days							
	D3		D7		D14		D21	
2 mg MIA	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
SP	109.3	11.4	109.3	5.7	129.4	13.2	147.4	12.9
CGRP	632.5	82.1	930.6	79.9	964.1	93.3	1064.8	176.7
BK	193.2	57.4	365.6	26.1	297.3	63.3	354.4	13.7
STT	157.2	39.2	518.3	111.6	581.5	163	721.8	50.4

Descriptive statistics of the mean spinal temporal concentration (fmol/mg)  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) at day (D) 3, D7, D14 and D21 post induction of osteoarthritis (OA) by 2 mg of monosodium iodoacetate (MIA). Intra-articular (right stifle) injection of MIA was performed on D0.

#### 2.4.5.3 Comparative regulations of spinal neuropeptides

At D21, compared to the naïve group (**Figure 29**), both MIA groups presented a similar increase in [SP] (adj-*P* = 0.016), with 1 mg (RR of  $1.67 \pm 0.15$ ) and 2 mg (RR of  $1.77 \pm 0.16$ ), respectively. The spinal concentration of this neuropeptide was also higher in both MIA groups (adj-*P* = 0.029) compared to the sham group (RR ratio of  $1.26 \pm 0.14$ ), with no difference between MIA groups (adj-*P* = 0.343). Punctual IA injections of lidocaine resulted in a [SP] decrease for the 2 mg MIA-L group (RR of  $1.43 \pm 0.09$ ) compared to 2 mg MIA group alone (adj-*P* = 0.029), but no statistical difference with 1 mg MIA (adj-*P* = 0.086) or sham (adj-*P* = 0.057) groups were observed. Naïve and sham groups had also lower [SP] than 2 mg MIA (adj-*P* < 0.05). The profile of comparison was similar for the other neuropeptides, namely CGRP, BK and STT at D21, with specific differences: for CGRP, the sham injection resulted in a significant increase (RR of  $1.22 \pm 0.07$ ), in comparison with the naïve group (adj-*P* = 0.016) and lidocaine ( $2.09 \pm 0.27$ ) treatment of 2 mg MIA group resulted with no difference compared to no treated rats (adj-*P* = 0.200); for BK, only the 2 mg MIA group (RR of  $1.70 \pm 0.07$ ) had a significant increase compared to the naïve (adj-*P* = 0.016) and sham (adj-*P* = 0.029) groups. Punctual lidocaine injections of 2 mg MIA rats (RR of  $1.40 \pm 0.23$ ) also caused a [BK] decrease (adj-*P* = 0.029) compared to 2 mg MIA alone, but higher than sham group (adj-*P* = 0.029), with no difference with 1 mg MIA group (adj-*P* = 0.743); for the inhibitory pain pathway implicated

by STT, the 2 mg MIA group (RR of  $3.18 \pm 0.22$ ) had a higher increase than naïve ( $\text{adj-}P = 0.016$ ), sham ( $\text{adj-}P = 0.029$ ) and 1 mg MIA ( $\text{adj-}P = 0.029$ ) groups, but no difference when compared to the treated 2 mg MIA-L group (RR of  $2.82 \pm 0.58$ )( $\text{adj-}P = 0.343$ ). Descriptive statistics of neuropeptide spinal concentration without normalisation for all experimental groups at D21 are presented in **Tableau XII**.



**Figure 29. Neuropeptide spinal cord concentrations.**

Mean relative ratio (normalised with naïve group) of spinal concentrations  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 21 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection. A relative ratio of 1 indicates the concentration in normal rats and is represented by the horizontal gray zone ( $1.00 \pm 0.26$ ). The MIA injection induced an up-regulation at D21 of all neuropeptides compared to naïve ( $\text{adj-}P = 0.016$ ) and sham rats ( $\text{adj-}P = 0.029$ ), with no difference in neuropeptide increase between both doses of MIA, except for STT (higher in the 2 mg group, ( $\text{adj-}P = 0.029$ )). Punctual intra-articular injections of lidocaine resulted in a decrease of SP and BK compared to 2 mg MIA alone ( $\text{adj-}P = 0.029$ ). \*, #, Ø, Intergroup significant difference compared to naïve, sham and 2 mg MIA groups respectively ( $\text{adj-}P < 0.05$ ).



**Tableau XIII. Spinal concentration of neuropeptides.**

Neuropeptides (fmol/mg)	Groups									
	Naïve		Sham		1 mg		2 mg		2 mg MIA-L	
Day 21	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
SP	83.1	17.0	104.5	11.3	138.4	12.9	147.4	12.9	119.0	7.3
CGRP	463.98	91.7	566.9	34.7	964.4	41.9	1064.8	176.6	971.8	123
BK	208.7	41.2	182.0	41.8	296.1	75.3	354.4	13.7	292.4	47.7
STT	226.9	39.1	303.6	83.7	498.9	75.6	721.8	50.4	639.2	131.2

Descriptive statistics of the mean spinal concentration (fmol/mg)  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 21 days (D) following the intra-articular (right stifle) injection of monosodium iodoacetate (MIA). Intra-articular injection was performed on D0 (1 or 2 mg of MIA for the MIA groups, 0.9 % NaCl for the sham group and nothing for rats in naïve group). The MIA-L group with 2 mg of MIA also received an intra-articular injection of lidocaine in the right stifle on D7, 14, and 21, at 25 minutes before the punctate tactile allodynia evaluation.

#### 2.4.5.4 Cartilage lesions

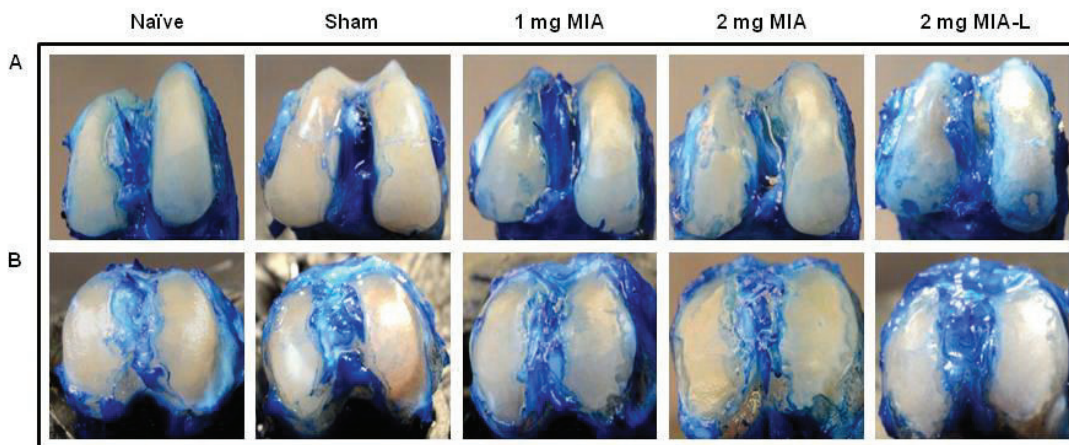
**Tableau XIV** summarises the lesion scores after injection of MIA at 1 or 2 mg, or saline 0.9 % (sham), at different time-points of assessment, in comparison to the naïve group (expected to be free of lesions). Only the 2 mg MIA dose with or without lidocaine injection resulted in a higher score than naïve at D21 (adj- $P = 0.01$ ), whereas the sham and 1 mg MIA groups had no significant increase in scoring. Temporal sacrifice of rats at D3, D7, D14 and D21 after injection demonstrated that MIA at 2 mg induced cartilage lesions that were statistically significant only at D21 (adj- $P = 0.02$ ) when compared to D3 (**Tableau XIV**). Images of difference in cartilage damages for the five experimental groups from femoral condyle and tibial plateau (medial and lateral) stained with a solution of Evans blue are showed in **Figure 30**.

**Tableau XIV. Cartilage lesion scores.**

Group	Mean ± SEM <sup>a</sup>		Adj- <i>P</i>	Comparison group <sup>b</sup>
Naïve D21	4.89 ± 0.73	[3.60 – 6.54]		
Sham D21	5.63 ± 0.84	[4.16 – 7.61]	0.898	Naïve
<b>MIA</b>				
1 mg D21	5.50 ± 0.83	[4.05 – 7.47]	0.942	Naïve
2 mg D21	9.00 ± 1.06*	[7.09 – 11.43]	<b>0.010</b>	Naïve
2 mg-L D21	9.11 ± 0.99*	[7.22 – 11.28]	<b>0.010</b>	Naïve
2 mg D3	5.13 ± 0.80	[3.72 – 7.06]		
2 mg D7	5.00 ± 0.79	[3.62 – 6.91]	0.999	2 mg MIA D3
2 mg D14	5.63 ± 0.84	[4.14 – 7.63]	0.945	2 mg MIA D3
2 mg D21	9.00 ± 1.06**	[7.07 – 11.46]	<b>0.020</b>	2 mg MIA D3

<sup>a</sup>Values are the least square means and standard error of the mean (SEM) of the total score for 4 compartments (maximum score of 16) for each group. Values in brackets are the minimum and maximum (respectively) value for each group. Naïve, sham, 1 mg, 2 mg MIA and 2 mg MIA-L groups were evaluated 21 days (D) after MIA injection.

<sup>b</sup>Multiple comparison group's effects were performed using naïve group as control group (\*adj-*P* < 0.05). 2 mg MIA D3, D7, D14 and D21 groups are evaluated temporally at D3, D7, D14 and D21 respectively, and multiple comparison group's effects were performed using 2 mg MIA D3 group as control group (\*\*adj-*P* < 0.05). Only the dose of 2 mg of MIA alone or treated with lidocaine (L) (adj-*P* = 0.01) caused significant apparent cartilage lesions, which appeared at D21 post-induction (adj-*P* = 0.02).



**Figure 30. Macroscopic cartilage lesions of the right stifles.**

Macroscopic cartilage lesions of the right stifles 21 days after injection of monosodium iodoacetate (1 or 2 mg), lidocaine, 0.9 % NaCl (sham) or nothing (naïve). Upper line (A) showed images of cartilage damage from femoral condyle (lateral and medial) and lower line (B) from tibial plateau (medial and lateral) stained with a solution of Evans blue. Cartilage damage is strongly apparent in 2 mg MIA and 2 mg MIA-L groups whereas is less visible in 1 mg MIA group. Injection of 0.9 % NaCl (sham) seems to produce some low degree of cartilage damage.

## 2.4.6 Discussion

It is well established that the chemically-induced stifle OA MIA rat model demonstrates histopathologic changes and pain-like behaviours that mimic human OA (Marker and Pomonis 2012; Kalbhen 1987). Structural pathology following MIA injection appears progressively, with an early inflammation phase (*i.e.*, 3 days post-MIA injection) decreasing with time, while activating transcription factor (ATF)-3, a nerve injury marker, was observed at later time points (8–14 days post-MIA injection) (Ivanavicius, Ball et al., 2007). We observed a similar pattern with temporal sacrifice of rats receiving 2 mg MIA with an early increase in spinal concentration of all four neuropeptides tested, between D3 and D7 for CGRP, BK and STT, and between D7 and D14 for SP (see **Figure 28**). The increase plateaued subsequently up to D21. The up-regulation of spinal neuropeptides suggests an activation of the peptidergic afferent C-fibers, resulting in central sensitisation (Abaei, Sagar et al., 2016; Im, Kim et al., 2010). This mechanistic neuropeptidic sensitisation was translated in phenotypic tactile allodynia present in the 2 mg MIA group as soon as D3 and maintained up to D21. The tactile allodynia was also induced by the 1 mg MIA injection, but not so sustained. The up-regulation in spinal tachykinin SP, and CGRP, is in line with recent studies (Bullock, Wookey et al., 2014; Otis, Gervais et al., 2016; Ferland, Lavery et al., 2011), which reported their contribution to the progression from nociception to sensitisation in addition to their involvement in peripheral sensitisation and inflammation in arthritic joints (Howard, Millward-Sadler et al., 2008; Xiao, Yu et al., 2016). This is in line with previous studies (Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Pomonis, Boulet et al., 2005) that showed MIA injection caused allodynic pain. Interestingly, the sham group presented too some tactile allodynia over time, and an increased CGRP spinal expression at D21. The absence of analgesic efficacy observed with IA lidocaine at D21 was not expected, particularly with the evident efficacy at D7 and D14. It must be noted that, at D21, the neuropeptidomic comparison between the 2 mg MIA and 2 mg MIA-L groups showed a difference in SP and BK, but not for CGRP and STT. These results with the sham group, and the absence of difference in tactile allodynia between the three MIA groups at D21 could suggest that CGRP would be the most sensitive spinal biomarker related to the induction of tactile allodynia. The observed up-regulation of spinal BK following MIA injection was demonstrated previously, but in synovial fluid with the use of an antagonist

of the kinin B<sub>2</sub> receptor to reduce OA pain (Cialdai, Giuliani et al., 2009). In the present study, it could also be related to a decreased expression after IA analgesic treatment. Interestingly, STT is well recognised as a pain inhibitory neuromodulator (Prasoon, Kumar et al., 2015) by acting on somatostatin receptors in primary afferent neurons and it was the only neuropeptide to distinguish a dose-effect of MIA injection, suggesting a higher involvement of the pain inhibitory pathway with the higher dose of MIA. This was also associated to the maintenance of tactile allodynia in the 2 mg MIA group up to the final day of assessment (D21), but not in the 1 mg MIA group (only present at D3 and D7). This sensitivity of STT was reinforced by a parallel increase in structural cartilage damage. Stifle joint evaluations revealed no statistically significant change in cartilage lesions at D21 for 1 mg MIA unlike cartilage damage caused by 2 mg MIA. Concomitantly, a lower up-regulation of the inhibitory neuropeptide STT in the 1 mg MIA group at D21, and the 2 mg MIA group at D3 (too early for the recruitment of inhibitory mechanism), spinal cord translated to a lower necessary contribution of the inhibitory pathway. Exogenous administration of a natural STT analogue has been associated with allodynia reduction in chronic (later) pain and participated in the tuning of pain sensitisation in pathologic inflammatory conditions, including OA (Morell, Souza-Moreira et al., 2013; Segond von Banchet 2008). It has been reported that the cartilage lesion severity was proportional to the MIA dose injected (Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Janusz, Hookfin et al., 2001) as we observed in our macroscopic evaluation. In addition, it was only after 21 days following OA induction with 2 mg MIA that cartilage seemed to be severely enough damaged to mimic OA damage as previously observed (Janusz, Hookfin et al., 2001) and supported by the concomitant up-regulation of all four neuropeptides.

Injection of saline in the sham group also caused the release of neuropeptides (statistically significant for CGRP) and some degree of allodynia. This contributes to the genesis of hyperalgesia or allodynia by IA injection of saline in the rat stifle joint, as assessed by behavioural sensory-reflexive evaluation in this study or operant tests (Otis, Gervais et al., 2016). This confirms that this negative control group is not entirely neutral and some inflammatory and nociceptive pain is triggered, which needs to be considered for future study.

Spinal SP and CGRP neuro-transmitters have demonstrated a good sensitivity to detect responsiveness to analgesics, such as IA lidocaine (Otis, Gervais et al., 2016), IA resiniferatoxin (Kim, Kim et al., 2016) and proteasome inhibitor MG132 (Ahmed, Li et al., 2012) in the MIA

OA pain model in rats. Punctual IA administration of lidocaine at D7, D14 and D21 resulted in this study, at D21, in a down-regulation of SP and BK in the rat 2 mg MIA model as previously demonstrated (Otis, Gervais et al., 2016).

### **2.4.7 Conclusion**

In conclusion, we demonstrated that the MIA model of OA pain in rats showed an activation of the peptidergic afferent C-fibers with spinal neuropeptide up-regulation observed in this study. Within-time evolution of tactile allodynia, comparative cartilage lesion scoring and STT spinal quantification methods were sensitive enough to discriminate between the two doses of MIA. The increase in the four neuropeptides level and tactile allodynia progress support the central sensitisation observed in the MIA rat OA pain model. It appears that CGRP would be the most sensitive spinal biomarker related to the induction of tactile allodynia. Cartilage damage was significant in the 2 mg MIA group, while in the 1 mg MIA group, damage was less apparent. Saline injection produced a low degree of cartilage damage, tactile allodynia and an up-regulation of CGRP neuropeptide, which needs to be taken into consideration.

We confirmed our hypothesis that the modulation of spinal neuropeptides response in a MIA rat OA pain model can be detected, quantified and elucidated, particularly at the proteomic level in the spinal cord and translated, at least in part, into macroscopic cartilage damage and behavioural pain assessment sensitivity. The present results highlight the potential use for these neuropeptides as pharmacological biomarkers for analgesic efficacy testing.

### **2.4.8 Competing interests**

This study was partly supported by a Collaborative Research and Development grant (#RDCPJ 491953–2016, supporting operations and salaries) in partnership with ArthroLab, Inc. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Johanne Martel-Pelletier and Jean-Pierre Pelletier are shareholders in ArthroLab, Inc. The Pfizer Canada sponsor was given the opportunity to review the manuscript and comment. There are no patents, products in development or marketed products to declare. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### **2.4.9 Authors' contributions**

CO carried out all the experiments, designed the studies, interpreted data and wrote the manuscript. MG performed all the statistical analysis and participated in the interpretation of data. MM supervised the study and participated in the statistical analysis and the revision of the manuscript. J-PP and JM-P participated to the manuscript revision and study elaboration. FB collaborated in the neuropeptides quantification and revision of the manuscript. ET conceived, designed and supervised the whole study. ET was also involved in the interpretation of data and manuscript editing. All authors read and approved the final manuscript.

### **2.4.10 Acknowledgements and funding**

The authors would like to thank the personnel of ArthroLab, Inc. for their professionalism, support and active contribution to the success of the experiments.

This work was supported by Discovery grants (#441651-2013; Eric Troncy – #386637-2010; Francis Beaudry, supporting salaries), and a Collaborative Research and Development grant (#RDCPJ 491953–2016; Eric Troncy, supporting operations and salaries in partnership with ArthroLab, Inc.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, as well as by an ongoing New Opportunities Fund grant (#9483; Eric Troncy), a Leader Opportunity Fund grant (#24601; Eric Troncy), supporting pain/function equipment from the Canada Foundation for Innovation, and the Chair in Osteoarthritis of the Université de Montréal. This study was funded by a Pfizer Neuropathic Pain Research award (#WS386180; Eric Troncy) from Pfizer Canada, Inc.

Dr. Martin Guillot was the recipient of an Alexander Graham Bell NSERC Canada Graduate Scholarship for doctorate research, and a Doctoral Scholarship from the Canadian Institutes of Health Research – MENTOR Strategic Training Initiative in Health Research Program. Dr. Maxim Moreau received a doctoral scholarship from the Fonds de recherche du Québec-Santé, and a Doctoral Scholarship from the Canadian Institutes of Health Research – MENTOR Strategic Training Initiative in Health Research Program.



## 2.4.11 References

- Abaei M, Sagar DR, Stockley EG, et al. (2016) Neural correlates of hyperalgesia in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain. *Mol Pain* 12.
- Ahmed AS, Li J, Erlandsson-Harris H, et al. (2012) Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. *Pain* 153: 18-26.
- Bowles RD, Mata BA, Bell RD, et al. (2014) In vivo luminescence imaging of NF-kappaB activity and serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 66: 637-46.
- Bullock CM, Wookey P, Bennett A, et al. (2014) Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheumatol* 66: 2188-200.
- Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
- Cialdai C, Giuliani S, Valenti C, et al. (2009) Effect of Intra-articular 4-(S)-amino-5-(4-{4-[2,4-dichloro-3-(2,4-dimethyl-8-quinolyloxymethyl)phenylsulfonylamido]-tetrahydro-2H-4-pyran-2-yl}piperazin-5-yl)-5-oxopentyl-(trimethyl)ammonium chloride hydrochloride (MEN16132), a kinin B2 receptor antagonist, on nociceptive response in monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 1025-32.
- Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, et al. (2011) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 603-10.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. (2004) Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112: 83-93.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, et al. (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 40: 1670-9.
- Howard MR, Millward-Sadler SJ, Vasilliou AS, et al. (2008) Mechanical stimulation induces preprotachykinin gene expression in osteoarthritic chondrocytes which is correlated with modulation of the transcription factor neuron restrictive silence factor. *Neuropeptides* 42: 681-6.

- Im HJ, Kim JS, Li X, et al. (2010) Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* 62: 2995-3005.
- Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, et al. (2007) Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128: 272-82.
- Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, et al. (2001) Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 751-60.
- Kalshen DA (1987) Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 14 Spec No: 130-1.
- Kelly S, Chapman RJ, Woodhams S, et al. (2015) Increased function of pronociceptive TRPV1 at the level of the joint in a rat model of osteoarthritis pain. *Ann Rheum Dis* 74: 252-9.
- Kidd BL, Mapp PI, Blake DR, et al. (1990) Neurogenic influences in arthritis. *Ann Rheum Dis* 49: 649-52.
- Kim Y, Kim EH, Lee KS, et al. (2016) The effects of intra-articular resiniferatoxin on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 20: 129-36.
- Kohno T, Wang H, Amaya F, et al. (2008) Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci* 28: 4533-40.
- Latremoliere A and Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10: 895-926.
- Le Greves P, Andersson K and Silberring J (1997) Isolation and identification of CGRP C-terminal fragments in the rat spinal cord. *Neuropeptides* 31: 19-23.
- Loeser JD and Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137: 473-7.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. (2012) Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64: 1697-707.
- Malavolta L and Cabral FR (2011) Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides* 45: 309-16.



- Malfait AM and Miller RJ (2016) Emerging Targets for the Management of Osteoarthritis Pain. *Curr Osteoporos Rep* 14: 260-68.
- Marker CL and Pomonis JD (2012) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol Biol* 851: 239-48.
- Morell M, Souza-Moreira L, Caro M, et al. (2013) Analgesic effect of the neuropeptide cortistatin in murine models of arthritic inflammatory pain. *Arthritis Rheum* 65: 1390-401.
- Otis C, Gervais J, Guillot M, et al. (2016) Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. *Arthritis Res Ther* 18: 150.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114: 339-46.
- Prasoon P, Kumar R, Gautam M, et al. (2015) Role of somatostatin and somatostatin receptor type 2 in postincisional nociception in rats. *Neuropeptides* 49: 47-54.
- Saidi M, Kamali S and Beaudry F (2016) Characterization of Substance P processing in mouse spinal cord S9 fractions using high-resolution Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Neuropeptides* 59: 47-55.
- Segond von Banchet G (2008) [Somatostatin - an important inhibitor of neuronal activity]. *Schmerz* 22: 409-14.
- Woolf CJ (1996) Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* 66: 105-8.
- Xiao J, Yu W, Wang X, et al. (2016) Correlation between neuropeptide distribution, cancellous bone microstructure and joint pain in postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Neuropeptides* 56: 97-104.
- Zhang L, Tanabe K, Yanagidate F, et al. (2014) Different effects of local anesthetics on extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in rat dorsal horn neurons. *Eur J Pharmacol* 734: 132-6.

## **2.5 Testing pregabalin analgesic efficacy in a rat model of osteoarthritis pain: interest in functional neuropeptidomics**

Cet article, soumis dans *Neuropharmacology*, souligne l'importance d'utiliser des méthodes fiables et sensibles comme la quantification neuroprotéomique pour détecter les effets analgésiques d'un composé pharmacologique en phase expérimentale de façon concomitante avec des outils d'évaluation fonctionnelle de la douleur. Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité analgésique d'une administration préventive ou curative de la prégabaline dans le modèle d'induction chimique d'arthrose chez le rat en utilisant des méthodes d'évaluation fonctionnelle et neuroprotéomique de la douleur.

Les résultats de cette étude montrent que la quantification des neuropeptides spinaux est la méthode la plus sensible afin de détecter l'efficacité analgésique d'un composé au-delà des évaluations fonctionnelles de la douleur, mais que ces méthodes sont tout de même des outils complémentaires.

Mme Colombe Otis a participé à la conception du schéma expérimental, aux manipulations des rongeurs, aux évaluations fonctionnelles de la douleur ainsi qu'aux mesures neuroprotéomiques, à l'acquisition et aux traitements des données et puis elle a assisté Dr Guillot pour les analyses statistiques de ces dernières. Pour la rédaction de cet article, Mme Otis était premier auteur et a donc participé activement à sa rédaction, à la recherche littéraire, à l'infographie de toutes les figures et tableaux de l'ensemble du manuscrit. Elle a également modifié et enrichi l'article suite aux commentaires par les réviseurs afin que ce manuscrit soit bonifié et re-soumis pour publication.

Colombe Otis<sup>1,2</sup>, Martin Guillot<sup>1,2</sup>, Maxim Moreau<sup>1,2</sup>, Francis Beaudry<sup>1,2</sup>, Eric Troncy<sup>1,2</sup>

### **2.5.1 Abstract**

The monosodium iodoacetate (MIA)-induced joint degeneration in rats is the most used animal models to screen analgesic drugs to alleviate osteoarthritis (OA) pain. The aim of this study was to evaluate the analgesic efficacy of pre-emptive or curative pregabalin (PGB) medication in an inducted-OA MIA model in rodents by using functional and neuroproteomic pain assessment methods. Treatment group included PGB in pre-emptive or curative medication in the first and second phase, respectively. Functional assessments of pain (spontaneous, reflexive and operant) were performed concomitantly with spinal neuropeptides quantification. Pre-emptive PGB treatment reversed shift in weight-bearing ( $P = 0.04$ ) and reduced tactile allodynia ( $P = 0.03$ ) compared to MIA rats treated with a placebo. Pre-emptive PGB showed no modification in operant evaluation. Pre-emptive PGB induced a down-regulation in excitatory spinal neuropeptides, such as substance P, calcitonin gene-related peptide and bradykinin, in MIA rats at sacrifice compared to MIA rats receiving the placebo ( $P < 0.01$ ). Curative PGB medication in MIA rats failed to counteract the asymmetry of weight distribution generated on the right hind limb after OA induction. Curative PGB in MIA rats reduced tactile allodynia ( $P = 0.048$ ) and improved the place/escape avoidance behavior (operant evaluation,  $P = 0.025$ ) compared to values recorded at last time-point before initiating curative therapy. All spinal neuropeptide concentrations came back to normal (non affected) rat values, compared to their increase observed in MIA rats receiving the placebo ( $P < 0.0001$ ). This study highlights

---

<sup>1</sup> Animal Pharmacology Research Group of Quebec (GREPAQ) – Department of veterinary biomedicine, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, St.-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada

<sup>2</sup> Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Pavillon R, Montreal (QC), H2X 0A9 Canada

the importance of using reliable and sensitive methods like neuroproteomic quantification to detect the analgesic effects of a test article with concomitant functional assessments of pain.

### 2.5.2 Keywords

Pregabalin, Neuropeptide, Osteoarthritis, Animal model, Monosodium iodoacetate

### 2.5.3 Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic joint disorder whose principal symptom is movement evoked or ongoing joint pain; as a result, OA can profoundly affect the quality of life of the sufferer (Hunter, McDougall et al., 2008; Schaible 2012). Current analgesics are modest at best at tolerable doses, or are hampered by significant adverse effects with dose escalation. The mechanisms contributing to this pain are poorly understood but likely to include both local joint changes and central consequences. Understanding the mechanisms driving this pain is important since the efficacy of current analgesics, which principally target the peripheral sensitization in the joint driving this pain, is limited (Zhang, Nuki et al., 2010).

In inflammatory, and likely in OA pain, the increased nociceptive input from the periphery triggers the neurophysiological plasticity defined as central sensitization, whereby dorsal horn neurons show decreased threshold to peripheral noxious stimuli, *de novo* excitation by innocuous stimuli, increased spontaneous activity and expansion of receptive fields (Sandkuhler 2009; Schaible, Richter et al., 2009). The subsequent release of excitatory neurotransmitters, glutamate and neuropeptides (Woolf 1996) such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), from the central terminals of sensitized nociceptive fibers leads, in part, to phosphorylation of the *N*-methyl-D-aspartate receptor and an increase in intracellular calcium ion, which finally is translated to long lasting transcriptional and post-translational changes (Woolf and Thompson 1991). Indeed, in an OA rat model, higher levels of neuropeptides, such SP and CGRP have been found in the spinal cord (Otis, Gervais et al., 2016; Ferland, Laverty et al., 2011).

The chemical monosodium iodoacetate (MIA) induced joint degeneration in rats is one of the most used animal models to screen analgesic drugs to alleviate OA pain (Bove, Flatters et al., 2009; Kuyinu, Narayanan et al., 2016; Little and Zaki 2012; Rahman, Patel et al., 2015).

Having established a high-level sensitivity method for quantifying spinal neuropeptides (Beaudry, Ferland et al., 2009; Ferland, Laverty et al., 2011; Ferland, Pailleux et al., 2011), our group, recently (Otis, Gervais et al., 2016) tested their reliability and validity as pain outcome in MIA-induced OA: spinal nociceptive neuropeptides demonstrated face (high responsiveness to OA induction), construct (high specificity with lower concentration in naïve and sham rats), and criterion-related validity (high sensitivity to detect analgesic response to punctual intra-articular (IA) lidocaine administrations); their time-response was also determined (Ferland, Pailleux et al., 2011), demonstrating also repeatability and test-retest reliability, as well as reproducibility in different chemical or surgical OA models in rats (Gervais, Otis et al., 2018). At the same time, functional pain assessment methods were tested and validated, either spontaneous (static and dynamic weight-bearing alteration), sensory-reflexive (tactile and mechanical withdrawal threshold), or operant (requiring pain integration) testing (Otis, Gervais et al., 2016). As of today, pain perception and its intensity in animals is mainly a subjective evaluation. Therefore, a concurrent validation approach, with functional neuropeptidomics as a reference, has demonstrated huge interest in determining test article analgesic efficacy in various pain conditions, and in various animal species (Rialland, Otis et al., 2014; Rialland, Otis et al., 2014).

Pregabalin (PGB) ((*S*)-3-(aminomethyl)-5-methylhexanoic acid) is an anticonvulsant and an analgesic drug analogue to gabapentin, binding to the alpha<sub>2</sub>-delta ( $\alpha_2$ - $\delta$ ) auxiliary subunit of voltage-dependent calcium channels in the central nervous system. Neurotransmitters that are sensitive to PGB or gabapentin includes glutamate from rat neocortex, entorhinal cortex, or hippocampus (Dooley, Mieske et al., 2000; van Hooft, Dougherty et al., 2002; Cunningham, Woodhall et al., 2004), spinal glutamate (Maneuf, Hughes et al., 2001), SP and CGRP from spinal cord dorsal horn (Fehrenbacher, Taylor et al., 2003) and norepinephrine from neocortex (Dooley, Donovan et al., 2002). A reduction of neurotransmitter release, particularly from hyper-excited or sensitized neuronal tissue, has been proposed as a primary mechanism of PGB action (Micheva, Taylor et al., 2006). In the rat MIA model (Rahman, Bauer et al., 2009), PGB significantly inhibited neuronal evoked responses in OA rats only, suggesting the implication of descending facilitation to play a role in mediating the innocuous mechanical punctate evoked neuronal response in this OA model. If the spinal and supraspinal sites of action of PGB are well-recognized, it may also indirectly impact on

neuroimmune factors, like proinflammatory cytokines, microglial activation, as well as reduce the ectopic peripheral discharges (*via* sodium channel blockade) and A-fiber hypersensitization.

Thus, our hypothesis was that PGB in the rat MIA model would lead to decreased central sensitization, manifested over functional (spontaneous, sensory-reflexive, and operant) assessments and spinal neuropeptidomic quantification. We also hypothesized that nociceptive neuropeptidomics quantification would be the most sensitive method to detect analgesic efficacy, and that pre-emptive administration of PGB (pPGB) would be more efficient than curative treatment with PGB (cPGB). Subsequently, this prospective, randomized, blinded and controlled study aimed to evaluate the analgesic efficacy of PGB in pre-emptive (pPGB, over 21 days) or curative (cPGB, over 9 days) administration using spontaneous, sensory-reflexive, operant, and neuropeptidomics pain assessment methods. In pre-emptive conditions, MIA-pPGB would be compared to negative control (MIA-placebo) as well as to sham-pPGB and sham-placebo controls, whereas curative treatment in MIA-induced rats would also compare cPGB to morphine as opioid, and carprofen as non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) therapy.

## **2.5.4 Materials and methods**

### **2.5.4.1 Animals**

Female ( $n = 60$ ) Sprague-Dawley rats (230-250 g) (Charles River Laboratories International Inc., Saint-Constant, QC, Canada) were housed in groups of two, with food and water *ad libitum*, and kept at a constant temperature of 22°C in a 12-hour light-dark cycle. During the study, care and use of animals were subject to and approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of Université de Montréal (N° Rech-1495) and conducted in accordance with principles outlined in the current Guide to the Care and Use of Experimental Animals published by the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health.

### **2.5.4.2 Experimental design**

At day (D) 0, rats pre-medicated with intramuscular buprenorphine (0.02 mg/kg, Reckitt Benckiser Inc., Mississauga, On, Canada), were mask-anesthetized with 2 % isoflurane in O<sub>2</sub>

to receive a single blinded IA (50 µL) injection of 2 mg MIA (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) or equivolume of 0.9 % sterile saline through the infrapatellar ligament of the right stifle as previously described (Otis, Gervais et al., 2016; Fernihough, Gentry et al., 2004; Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Vermeirsch, Biermans et al., 2007; Lampropoulou-Adamidou, Lelovas et al., 2013; Marker and Pomonis 2012). The study was sequenced in two parallel phases, one with pre-emptive, the other with curative PGB treatment.

#### *2.5.4.2.1 Pre-emptive treatment*

Rats ( $n = 41$ ) were randomly distributed in five groups and all treatments blinded:

**(1)** Test article group where rats ( $n = 14$ ) received an MIA IA injection at D0, associated to daily single oral pPGB gavage, as previously tested in rats with punctual (Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Rahman, Bauer et al., 2009) or serial administration (Mangaiarkkarsi, Rameshkannan et al., 2015) (30 mg/kg, Pfizer Canada Inc., Kirkland, Qc, Canada), from D-1 (the day preceding OA induction) to the end of follow-up (D21). A progressive sacrifice was conducted at D7 ( $n = 6$ ) and D21 ( $n = 8$ );

**(2)** Negative control group where rats ( $n = 12$ , with progressive sacrifice of 6 rats at D7 and D21) received an MIA IA injection at D0, and daily single oral vehicle placebo from D-1 to the end of follow-up (D21);

Two sham control groups where rats ( $n = 10$ ) received an IA injection of 0.9 % sterile saline at D0 with daily single oral **(3)** vehicle placebo ( $n = 6$ ) or **(4)** pPGB medication ( $n = 4$ ) from D-1 to D21; **(5)** Naïve control group where rats ( $n = 5$ ) did not receive IA injection, or any treatment, and were kept in the same conditions and sacrificed at the end (D21) of the follow-up.

#### *2.5.4.2.2 Curative treatment*

Rats ( $n = 19$ ) were randomly distributed in three groups, all blinded treatments were administered from D13 to D21, and all rats sacrificed at the end (D21) of the experiments:

**(6)** Test article group where rats ( $n = 6$ ) received MIA IA injection at D0, associated to daily single oral cPGB (30 mg/kg) treatment;

Positive control groups where rats ( $n = 13$ ) received an MIA IA injection at D0 with daily single subcutaneous **(7)** morphine standard dose (Ferreira-Gomes, Aadaes et al., 2012; Fernihough, Gentry et al., 2004; Nagase, Kumakura et al., 2012) (6 mg/kg, Sandoz Canada Inc.,

Boucherville, Qc, Canada,  $n = 8$ ) injection; or **(8)** carprofen standard dose (5 mg/kg, Zoetis Canada Inc., Kirkland, Qc, Canada,  $n = 5$ ) administration (Roughan and Flecknell, 2001).

#### **2.5.4.3 Functional assessment of nociception**

Testing was performed during the daylight phase, and was accomplished by the same (female) observer using the three assessment methods demonstrated as the most reliable in this model (Otis, Gervais et al., 2016). All animals were allowed to acclimate to testing conditions according to a validated acclimation protocol using five days of exposure to the apparatus over 2 weeks before the induction of OA as previously published (Otis, Gervais et al., 2016). Functional assessments were performed at one day before induction of OA for baseline values (D-1) and at D3, D7, D14 and D21 post-induction.

##### *2.5.4.3.1 Spontaneous evaluation*

The weight distribution through the right and left stifle was assessed using an Incapacitance Meter® (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) to measure static weight-bearing (SWB) distribution in the two hind limbs. The force exerted by each hind limb was measured and analyzed in grams, but reported in percentage of total body weight (% BW) to normalize the data. Rats were allowed to acclimate to the testing apparatus and when stationary, readings were taken over a 3-s period. Triplicates were taken simultaneously for each limb at each time point as established before (Otis, Gervais et al., 2016). An asymmetry of weight distribution suggest biomechanical alterations of the joint and can indirectly assess quality of life (Otis, Gervais et al., 2016).

##### *2.5.4.3.2 Sensory-reflexive evaluation*

Tactile sensitivity was assessed using an Electronic von Frey Anesthesiometer® (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) applied to the plantar surface of the hind paw, and by measuring the paw withdrawal threshold to von Frey ascending mechanical stimuli as previously described (Otis, Gervais et al., 2016). Gradually increasing pressure was applied with a mechanical von Frey polypropylene probe (0.7 mm<sup>2</sup>, Rigid Tip®, IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) fitted to a handheld force transducer. The stimulus was continued until the hind paw was withdrawn and considered indicative of the paw withdrawal threshold



(PWT). For each animal, triplicates of each hind paw were taken with a 60-s interval between each stimulus. The sensory-reflexive evaluation is a quantitative sensory testing, which detects tactile sensitivity development associated to secondary allodynia and hyperalgesia, recognized as a clinical expression of nociceptive sensitization (Cruz-Almeida and Fillingim, 2013).

#### *2.5.4.3.3 Operant evaluation*

The place escape/avoidance paradigm (PEAP) with nociceptive stimulation was used as operant testing apparatus for the preferential location of the rat (Boyce-Rustay, Zhong et al., 2010; Fuchs and McNabb 2012; Zhang, Zhang et al., 2011). Operant testing allows the quantification of behavioral responses at higher levels of the brain, reproducing multiple dimensions of pain, including affective and cognitive changes and not only sensory-discriminative perception (King, Vierck et al., 2003; Li 2013; Mauderli, Acosta-Rua Acosta-Rua et al., 2000; Navratilova, Xie et al., 2013; Vierck, Kline et al., 2003). If the rat was on the black side, the plantar surface of the right (ipsilateral to possible MIA IA injection) hind paw (RHP) was stimulated with a thin wire (60 g) every 15 s, to prompt withdrawal of the limb. When the rat was on the white side of the apparatus, a similar tactile stimulation was applied, but to the plantar surface of the left (contralateral) hind paw (LHP). The number of times passed in the black and white side of the test apparatus was calculated from observation of the preferential location every 15 s over a 20-minute period as previously described (Otis, Gervais et al., 2016).

#### **2.5.4.4 Proteomic analysis**

##### *2.5.4.4.1 Spinal cord sample preparation*

Entire rat spinal cords were rapidly collected at sacrifice; snap frozen and homogenized as previously published (Otis, Gervais et al., 2016).

##### *2.5.4.4.2 Neuropeptidomic analysis*

Neuropeptide quantification in spinal cord homogenate was achieved by high-resolution accurate mass spectrometry (*i.e.*, hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer) coupled with a high-performance liquid chromatography system. Data were acquired and analyzed as previously described (Otis, Gervais et al., 2016). Formic acid, trifluoroacetic acid and

ammonium bicarbonate were obtained from Sigma Aldrich, Inc. (Saint-Louis, MO, USA). The standards for SP, CGRP, bradykinin (BK) and somatostatin (STT) were purchased from Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Belmont, CA, USA). Deuterium labeled analogue peptides were synthesized *de novo* (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada). Peptides were quantified using an isotonic dilution strategy. Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific (NJ, USA), and ammonium hydroxide 28.0-30.0 % were purchased from J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, USA). The validation of the quantification of these four neuropeptides have been previously established (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017).

#### **2.5.4.5 Statistical analysis**

Non-parametric analyses and mixed models were applied using an alpha value set at 0.05 with a statistical software program (SAS system for Windows, version 9.2, Cary, NC, USA). Briefly, functional data were analyzed using mixed models for repeated measures. The normality of the outcomes was verified using the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance was assessed using the absolute values of the residuals of the mixed model, when appropriate. No transformation of data was used except averaging the 3 trials data, and PWT data were log-transformed to correct for heteroscedasticity of the residuals. Treatment groups, day and their interaction were considered as fixed effects with baseline (D-1) measurement as covariate. Moreover, for the curative conditions, treatment data (*i.e.*, those collected at D14 and D21) were compared to the last one values (*i.e.*, at D7) collected before introduction of the treatments (at D13), and adjusted with baseline (D-1) values. For neuropeptides quantification, D7 data ( $n = 12$  rats, 2 groups) were analyzed using exact Wilcoxon-Mann-Whitney tests. At D21, data ( $n = 43$  rats, 7 different groups) were compared using ANOVA followed by Tukey-Kramer *t*-test. Naïve control rats ( $n = 5$ ) were used in both situations (D7 and D21 measures) for normalizing neuropeptidomic values.

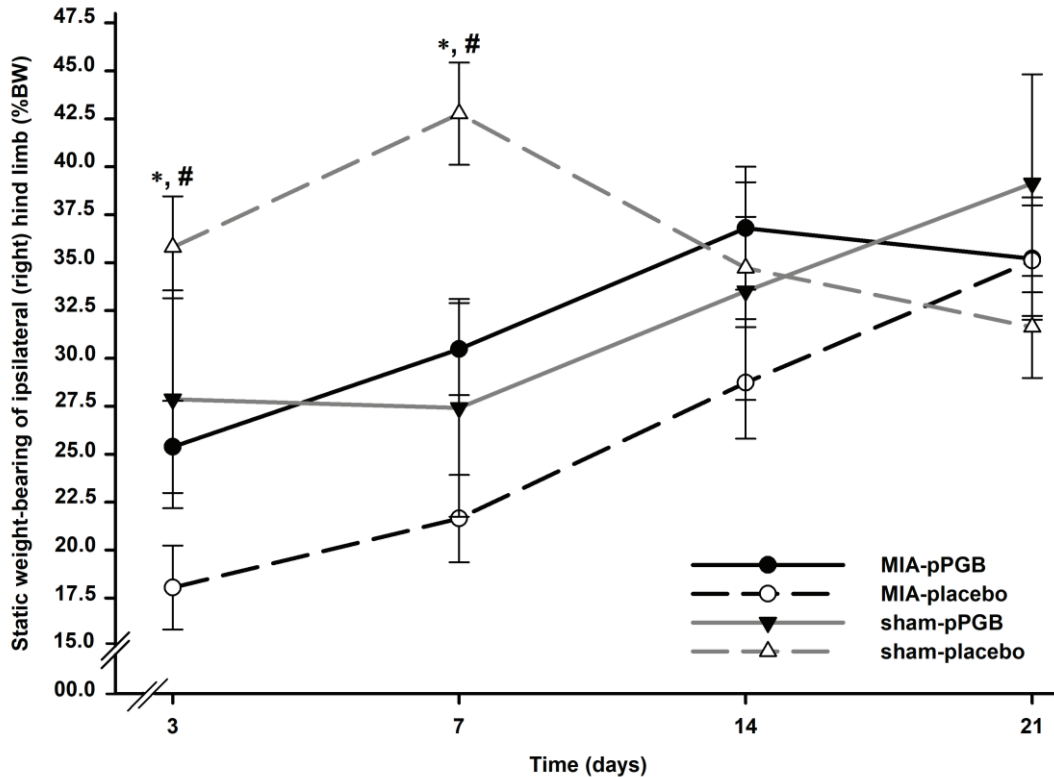
## 2.5.5 Results

### 2.5.5.1 Pre-emptive treatment

pPGB provided analgesia according to spontaneous, sensory-reflexive and neuropeptidomics pain assessment methods.

#### *2.5.5.1.1 pPGB treatment temporarily inhibited the right hind limb alteration in weight bearing induced by MIA, which is not maintained within time.*

The statistical analyses revealed significant time and treatment effects ( $P = 0.01$  and  $0.008$ , respectively) and a group treatment by time interaction ( $P = 0.001$ ). The planned comparisons of the whole treatment effect indicated that the MIA-placebo group presented a lower weight-bearing applied on the ipsilateral (right) hind limb compared to the sham-placebo group ( $P < 0.001$ ), as well as to the MIA-pPGB group ( $P = 0.04$ ). However, if the drop nadir of the right hind limb %BW was observed at D3 in the MIA-placebo group, it came back close to baseline as soon as D14 ( $P < 0.006$  for D14 and D21 compared to D3 value, and  $P = 0.048$  between D7 and D21) (**Figure 31**). In the three other groups, there was not such significant within-time difference. *Post-hoc* interaction analysis demonstrated a significant difference between MIA-placebo and both MIA-pPGB and sham-placebo at D3 ( $P < 0.03$ ) and D7 ( $P < 0.01$ ). No statistical difference for whole treatment effect was observed between MIA-pPGB, and sham-placebo ( $P = 0.195$ ) or sham-pPGB ( $P = 1.0$ ), as between sham-placebo and sham-pPGB ( $P = 0.757$ ), suggesting that pPGB counteracted the right hind limb alteration in weight bearing only in presence of OA pain induced by MIA.



**Figure 31. Ipsilateral (right) hind limb static weight-bearing evolution (least squares mean  $\pm$  standard error of the mean) for pre-emptive pregabalin medication.**

Pre-emptive treatment with pregabalin of rats (MIA-pPGB) with intra-articular monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis reversed the decrease in percentage body weight (% BW) observed in MIA-placebo rats ( $P = 0.04$ ). The latter decrease was also significant compared to the sham-placebo group ( $P < 0.001$ ). \*Significant difference between MIA-placebo rats in comparison of MIA-pPGB and sham-placebo at day (D) 3 ( $P < 0.03$ ) and D7 ( $P < 0.01$ ) post-induction of osteoarthritis. # Significant difference between MIA-pPGB and sham-placebo at D3 and D7 ( $P = 0.006$  and  $0.001$ , respectively) after osteoarthritis induction at D0.

#### 2.5.5.1.2 pPGB treatment completely reversed tactile allodynia.

The statistical analyses revealed a statistical significant treatment effect ( $P = 0.008$ ) but no effect of time ( $P = 0.939$ ) or group treatment by time interaction ( $P = 0.434$ ). Descriptive statistics for the RHP (ipsilateral) PWT over the evaluation period are provided in **Tableau XV**. The designed comparisons of the whole treatment effect indicated that the pPGB medication in MIA and sham groups, presented a higher RHP PWT than rats in the MIA-placebo group ( $P = 0.03$  and  $0.02$ , respectively). Tactile sensitivity of the paw was not modified between MIA-pPGB rats and sham-placebo or sham-pPGB groups ( $P = 0.983$  and  $0.182$ , respectively). No difference in tactile sensitivity was observed between sham groups with or without pPGB

medication ( $P = 0.10$ ). However, tactile allodynia developed as soon as D3 in the MIA-placebo group, and was maintained up to D21 ( $P > 0.18$  for all time-points compared to D3 value). In the sham-placebo group, a slight decrease in RHP PWT was observed, reaching statistical significance at D14 ( $P = 0.04$ , compared to baseline). In the two other groups, there was not such significant within-time difference. These results suggest that pPGB completely counteracted the RHP tactile allodynia induced by MIA injection (and sham procedure).

**Tableau XV. Mean and standard deviation (SD) of the punctate tactile allodynia evaluation by experimental group over days.**

Experimental Group	-1		3		7		14		21	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
MIA-pPGB	65.2	16.0	41.4	10.9	44.6	11.4	53.5	12.5	48.6	10.6
MIA-placebo	53.6 <sup>a</sup>	11.1	24.0 <sup>b</sup>	12.3	35.0 <sup>b</sup>	11.3	37.0 <sup>a,b</sup>	16.5	37.3 <sup>b</sup>	8.0
sham-pPGB	62.4	31.4	61.0	23.6	57.7	12.9	53.4	17.6	57.4	12.0
sham-placebo	57.9 <sup>a</sup>	14.3	53.4 <sup>a,b</sup>	12.9	44.5 <sup>a,b</sup>	14.4	38.0 <sup>b</sup>	17.0	43.8 <sup>a,b</sup>	13.4

Descriptive statistics of the paw withdrawal threshold of the right hind paw.<sup>a,b</sup> Different letters mean a statistically-supported difference within-time. Absence of letter means an absence of within-time statistical difference. <sup>c</sup>All rats received a daily single medication of pre-emptive pregabalin (MIA-pPGB and sham-pPGB groups) or placebo (MIA-placebo and sham-placebo). MIA: monosodium iodoacetate, pPGB: pre-emptive pregabalin treatment. <sup>d</sup>The measure was obtained for the four groups in grams on days 3, 7, 14 and 21 following the induction of OA (at day 0) and 1 day before for baseline values.

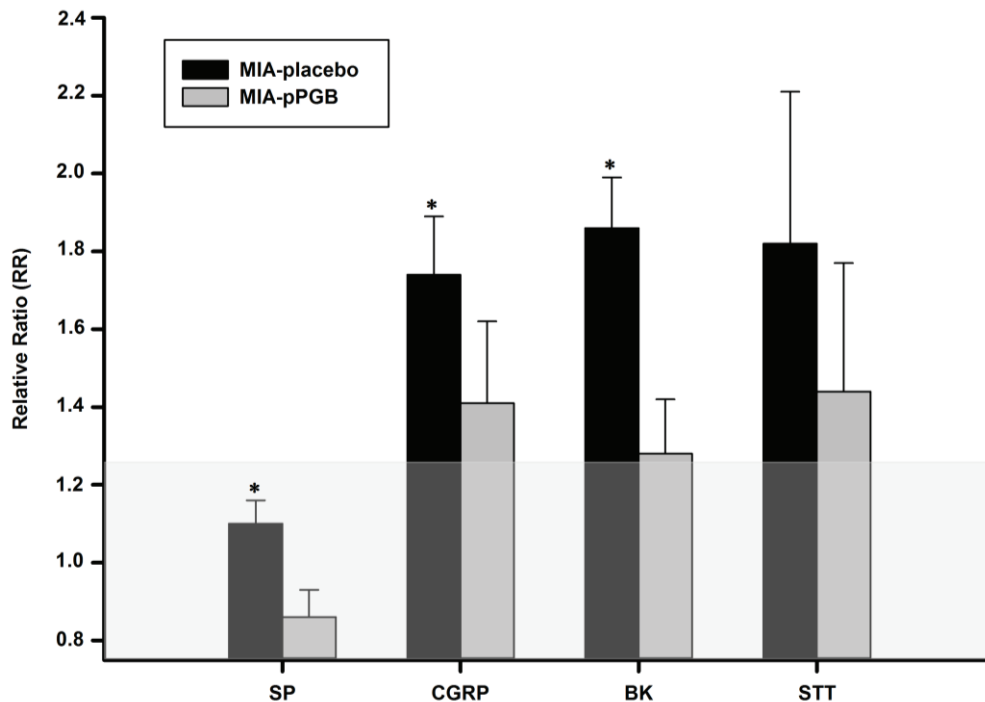
#### 2.5.5.1.3 PEAP failed to detect the effect of pPGB medication.

The statistical analyses showed no significant effect of time, treatment or interaction of group treatment by time ( $P = 0.099$ ,  $0.989$  and  $0.638$ , respectively) (data not shown).

#### 2.5.5.1.4 pPGB medication inhibited the increased expression of excitatory neurotransmitters.

Neuropeptide relative ratio (RR) concentrations (normalized by respective naïve group concentrations) at D7 in the spinal cord homogenate of the MIA-placebo and MIA-pPGB groups are illustrated in **Figure 32**. All spinal excitatory neuropeptide (namely, SP, CGRP and BK) concentrations were lower in MIA-pPGB rats compared to MIA-placebo rats ( $P < 0.01$ ). No difference in the spinal regulation of STT was observed between the MIA-placebo (RR  $1.82 \pm 0.39$ ) and MIA-pPGB (RR  $1.44 \pm 0.33$ ) groups ( $P = 0.233$ ). Interestingly, compared to naïve

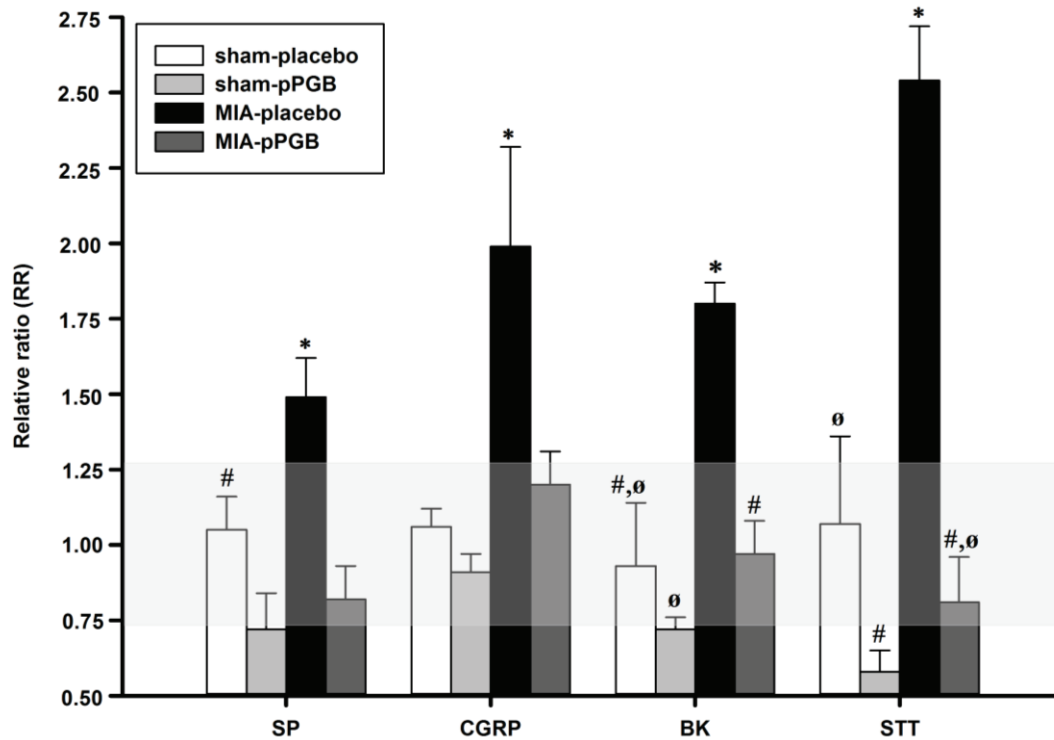
population concentration, the MIA-placebo group presented higher spinal expression of CGRP, BK and STT ( $P < 0.008$ ). However, pPGB medication abolished this increase (**Figure 32**).



**Figure 32. Mean relative ratio (normalized with naïve rats) of spinal concentrations  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene related-peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 7 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection for inducing osteoarthritis pain.**

A relative ratio of  $1 \pm$  SD indicates the concentration in normal rats and is represented by the horizontal gray zone ( $1.00 \pm 0.26$ ). At D7, MIA-placebo group presented a significant increase (compared to naïve group) in CGRP, BK and STT, but not SP. Pre-emptive treatment of MIA rats with pregabalin (MIA-pPGB) induced a significant down-regulation in SP, CGRP and BK excitatory neuropeptides compared with MIA-placebo rats ( $P < 0.01$ ). \* Between-groups significant difference for each neuropeptide.

**Figure 33** showed the neuropeptide regulations 21 days post-induction of OA. The MIA-placebo rats presented a significant up-regulation in all spinal neuropeptides ( $P < 0.0001$ ) compared to other treated-groups as well as naïve group. pPGB medication of MIA rats abolished this increase, keeping the concentration of each tested neuropeptide in the range of values expected for a naïve population. This was also the case for both sham groups. Compared to sham-placebo, pPGB medication led to a decrease in SP expression for both sham-pPGB ( $P = 0.006$ ) and MIA-pPGB ( $P = 0.03$ ). A significant decrease in STT spinal concentration was induced in sham-pPGB compared to sham-placebo ( $P = 0.007$ ), and MIA led to a higher spinal concentration of BK in pPGB-treated rats, compared to sham-pPGB ( $P = 0.03$ ).



**Figure 33. Mean relative ratio (normalized with naïve rats) of spinal concentrations  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 21 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection for inducing osteoarthritis pain.**

At D21, MIA-placebo group presented a significantly higher spinal concentration in all four neuropeptides ( $P < 0.0001$ ) compared to other treated groups as well as the naïve group. Pre-emptive treatment of MIA rats with pregabalin (MIA-pPGB) induced a significant down-regulation in SP, CGRP, BK and STT neuropeptides compared with MIA-placebo rats ( $p < 0.0001$ ). \*, #, Ø A different sign is indicating a significant between-groups difference for each neuropeptide.

### 2.5.5.2 Curative medication

cPGB provided analgesia according to sensory-reflexive, operant and neuropeptidomics pain assessment methods.

#### 2.5.5.2.1 cPGB treatment failed to counteract the right hind limb alteration in weight bearing induced by MIA.

Because of the time-course of ipsilateral (right) hind limb alteration in weight-bearing of MIA-placebo rats (coming back close to baseline as soon as D14, and D21), the statistical analysis failed to observe any group effect, but the time effect ( $P < 0.0001$ ) and group treatment by time interaction ( $P = 0.04$ ) were significant (data not shown). This was not the case for MIA-cPGB, but other analgesics were superior at D14, compared to the values recorded at D7, for

MIA-morphine ( $P = 0.02$ ) and MIA-carprofen ( $P = 0.03$ ). At D21, MIA-placebo and MIA-cPGB, compared to their D7 values, improved their right hind limb weight bearing ( $P < 0.048$ ).

#### 2.5.5.2.2 cPGB treatment partially reversed tactile allodynia.

Tactile sensitivity evaluation showed a time ( $P < 0.0001$ ) and an interaction of group treatment by time ( $P = 0.024$ ) effects, despite no group treatment difference ( $P = 0.144$ ). Descriptive statistics for the RHP (ipsilateral) PWT over the evaluation period are provided in **Tableau XVI**. At D21, RHP PWT in MIA-cPGB and MIA-morphine increased, compared to D7 ( $P = 0.048$ , and  $< 0.01$ ), the value in MIA-morphine rats being even higher than in MIA-placebo ( $P = 0.012$ ). The MIA-carprofen group demonstrated similar beneficial evolution without reaching significance, whereas course of RHP PWT for MIA-placebo did not change over time after D7.

**Tableau XVI. Mean and standard deviation (SD) of the punctate tactile allodynia evaluation by experimental group over days. Descriptive statistics for curative medication of the paw withdrawal threshold of the right hind paw.**

<sup>d</sup> Experimental Group	<sup>e</sup> Days									
	-1		3		7		14		21	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
MIA-cPGB	62.8 <sup>a</sup>	14.9	40.4 <sup>a,b</sup>	12.6	32.2 <sup>b</sup>	4.5	46.0 <sup>b,c</sup>	18.2	47.7 <sup>c</sup>	16.0
MIA-placebo	56.1 <sup>a</sup>	12.4	21.7 <sup>b</sup>	14.0	30.9 <sup>b</sup>	10.3	37.2 <sup>b</sup>	13.4	37.8 <sup>b,*</sup>	8.7
MIA-morphine	55.6 <sup>a</sup>	12.9	37.6 <sup>b</sup>	8.0	38.5 <sup>b</sup>	8.6	51.0 <sup>b,c</sup>	16.5	64.4 <sup>c,*</sup>	16.3
MIA-carprofen	53.8 <sup>a</sup>	21.5	36.2 <sup>b</sup>	8.0	44.1 <sup>a,b</sup>	12.0	57.0 <sup>a</sup>	13.4	55.9 <sup>a</sup>	11.9

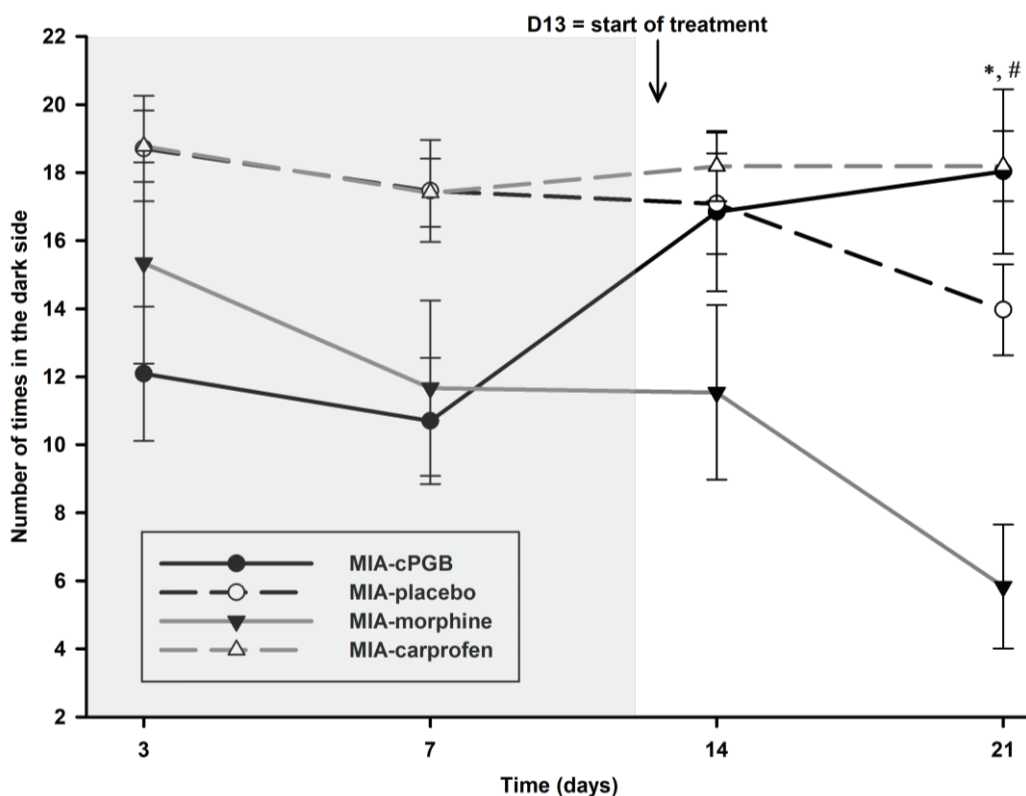
<sup>a,b,c</sup> Different letters mean a statistically-supported difference within-time. Absence of letter means an absence of within-time statistical difference. Treatment data (*i.e.*, D14 and D21) were compared to the last one values (D7) collected before introduction of the treatments (at D13). \*Significant inter-group time-point. <sup>d</sup>All rats received a daily single medication from day 13 to 21 of curative pregabalin (MIA-cPGB group), curative morphine (MIA-morphine) or curative carprofen (MIA-carprofen) or placebo (MIA-placebo). MIA: monosodium iodoacetate, cPGB: curative pregabalin treatment. <sup>e</sup>The measure was obtained for the four groups in grams on days 3, 7, 14 and 21 following the induction of OA (at day 0) and 1 day before for baseline values.

#### 2.5.5.2.3 cPGB treatment partially improved the operant test.

The statistical analyses revealed significant time and treatment effects ( $P = 0.035$  and  $0.017$ , respectively) and a group treatment by time interaction ( $P = 0.04$ ). The planned



comparisons of the whole treatment effect indicated no effect of cPGB compared to MIA-placebo, but MIA-morphine rats presented less comfort in apparatus dark side compared to other groups ( $P < 0.04$ ). Moreover, compared to D7 values of the same group, the rats passed less time in the dark side for the MIA-morphine group ( $P = 0.025$ ), but more for the MIA-cPGB group ( $P = 0.04$ ) at D21 (**Figure 34**).



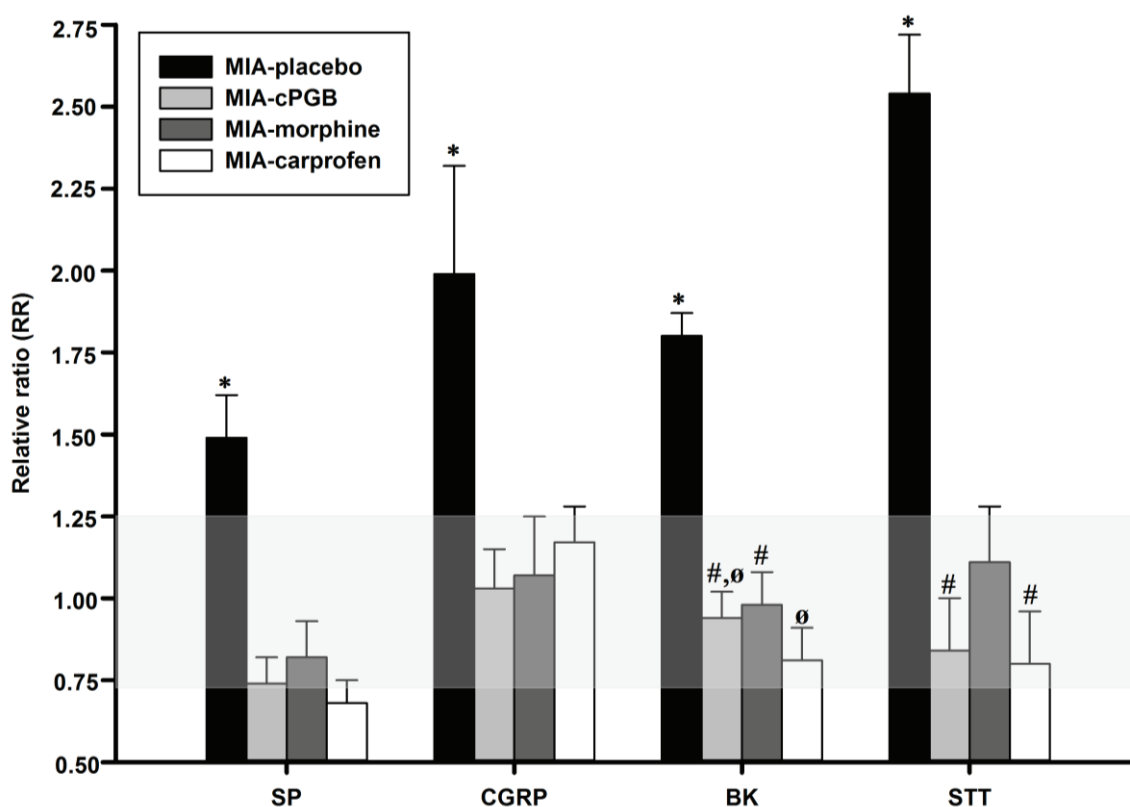
**Figure 34. Number of times in the dark side.**

Data are presented as the least squares mean  $\pm$  standard error of the mean for curative pregabalin medication for one 5 min period of assessment (10-15 min). At day (D) 21, the MIA-cPGB ( $*P = 0.04$ ) rats passed more time in the dark side, conversely to the MIA-morphine ( $\# P = 0.025$ ) group that passed less time in comparison to their respective D7 values. The gray zone represents the absence of curative treatment, which began at D13 after pain induction.

#### 2.5.5.2.4 Spinal cord neuropeptides quantification was a sensitive method to detect changes occurred by a curative medication.

Neuropeptide RR concentrations (normalized by respective naïve group concentrations) at D21 in the spinal cord homogenate of rats receiving curative medication are illustrated in **Figure 35**. Curative treatment over 9 days with cPGB, morphine or carprofen of MIA rats was

able to decrease all four neuropeptides concentration in spinal proteome compared with MIA-placebo rats ( $P < 0.0001$ ), keeping the concentration of each tested neuropeptide in the range of values expected for a naïve population. Moreover, the inhibition in STT expression induced by morphine was slightly lower than the one induced by cPGB ( $P = 0.048$ ) and carprofen ( $P = 0.046$ ). Finally, carprofen led to lower expression of spinal BK than morphine ( $P = 0.021$ ).



**Figure 35. Mean relative ratio (normalized with naïve rats) of spinal concentrations  $\pm$  standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT) 21 days (D) after monosodium iodoacetate (MIA) injection for inducing osteoarthritis pain.**

At D21, MIA-placebo group presented a significant higher spinal concentration in all four neuropeptides ( $P < 0.0001$ ) compared to other treated-groups as well as naïve group. Curative treatment of MIA rats with pregabalin (MIA-cPGB) induced a significant down-regulation in SP, CGRP, BK and STT neuropeptides compared with MIA-placebo rats ( $P < 0.0001$ ). \*, #, Ø A different sign is indicating a significant between-group difference for each neuropeptide.

## 2.5.6 Discussion

This study originally examined the analgesic efficacy of PGB administered in a pre-emptive or curative posology in a MIA rodent model of OA induction. To the best of our knowledge, only two previous reports, by the same group, tested PGB in the rat MIA-induced

OA model (Rahman, Bauer et al., 2009; Thakur, Rahman et al., 2012), and the posology was very different, three doses (0.3, 3 and 10 mg/kg SC) (Rahman, Bauer et al., 2009) and one dose (10 mg/kg) (Thakur, Rahman et al., 2012), tested once (at D14). The second original finding of this publication is the attractive interest of functional neuropeptidomics in quantifying response to various analgesics. Our observations confirm the likelihood of a neuropathic component of 2 mg MIA-induced OA that elicits ongoing, NSAID partially resistant, but morphine and PGB sensitive, pain and central sensitization that is associated with spinal expression of nociceptive neuropeptides.

It is well established that OA is the most common joint disorder, characterized as a multifactorial disease presenting different phenotypes, primary – either genetic, hormone-dependent, or age-related – or secondary – post-traumatic, metabolic –, and leading to a progressive degeneration of the articular cartilage, subchondral bone, and weakness of joint muscles, capsule and ligaments, in concert with inflammatory episodes within the joint touching particularly the synovium (Hinton, Moody et al., 2002). Pain in OA is the prominent medical problem and is by nature nociceptive, due to activation of nociceptive sensory receptors, and inflammatory, due to cell membrane breakdown and release of pro-inflammatory products, but includes too a majority of nociceptive hypersensitivity phenomenon (neuropathic component) (Woolf 1996). In the past, it was not understood that to treat OA pain, we need to treat the mechanisms that produce the pain, rather than just the disease itself. In OA patients, the pain experience is largely used-dependent and relates to the area surrounding the affected joint, however zones of referred pain also exist, and for instance muscle hyperalgesia and expansion of the peripheral receptive field region for pain has been demonstrated in OA patients, indicative of central sensitization (Bajaj, Bajaj et al., 2001). Painful prosthesis, *i.e.*, persistent pain following total hip and knee replacement, is common (10 to 20%) and could be related to prosthesis complication and/or pain memory (Beswick, Wylde et al., 2012; Lavand'homme and Thienpont 2015). Injury to the somatosensory system can produce ‘neuropathic’ pain that lasts for months or years after any injury has healed (Berger, Knaepen et al., 2011). Afflicted individuals exhibit hyperalgesia (exaggerated painful response to noxious stimulus), allodynia (generation of a painful sensation by an innocuous stimulus) and bouts of stimulus-independent ‘electric shock like’ pain (Mogil 2009). Unfortunately, neuropathic pain is poorly responsive to traditional (opioids and NSAIDs) analgesics, facilitating dose escalation (and side effects,

consequently) and even the  $\alpha_2$ - $\delta$  ligands, PGB and gabapentin, which are first line treatments (Finnerup, Attal et al., 2015), are not universally effective (Alles, Bandet et al., 2017). Injection of MIA into the stifle joint in rodent features pathophysiological and behavioral indices similar to human pain experience of OA (Fernihough, Gentry et al., 2004; Marker and Pomonis 2012; Combe, Bramwell et al., 2004; Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Janusz, Hookfin et al., 2001; Nwosu, Mapp et al., 2016; Pomonis, Boulet et al., 2005) thus the MIA model has, so far, proved useful for the understanding of OA chronic pain mechanism (Bove, Flatters et al., 2009; Kuyinu, Narayanan et al., 2016; Zhang, Ren et al., 2013), and improving its management.

A single IA injection of MIA into the femorotibial joint results in chondrocyte death (caused by disruption of glycolysis) and the development of an OA resembling human disease (Bove, Flatters et al., 2009; Guzman, Evans et al., 2003). Despite the fact that the relevance of MIA injection as a model of human OA has been questioned due to the rapid and extensive joint destruction that is induced (Thote, Lin et al., 2013; Little and Zaki 2012), and limited transcriptional similarity between rodent and human studies (Barve, Minnerly et al., 2007), the model is currently favored for screening drugs because of its rapidity and reproducibility (McCoy 2015). It has been suggested that MIA may be appropriate for screening symptom-modifying OA drugs, but its utility to be limited for disease-modifying OA drugs because its pathophysiology is so distinct from natural occurring disease (Bove, Flatters et al., 2009; Lampropoulou-Adamidou, Lelovas et al., 2013; Thote, Lin et al., 2013). Despite these disadvantages, rats are commonly used for screening of potential therapeutics prior to definitive evaluation in a large animal model (Cook, Hung et al., 2014). Standard analgesics such as NSAIDs (Bove, Calcaterra et al., 2003; Fernihough, Gentry et al., 2004; Pomonis, Boulet et al., 2005; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Ferland, Laverty et al., 2011; Nagase, Kumakura et al., 2012), morphine (Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Nagase, Kumakura et al., 2012; Pomonis, Boulet et al., 2005; Vonsy, Ghandehari et al., 2009) and tramadol (Combe, Bramwell et al., 2004; Nagase, Kumakura et al., 2012), amitriptyline (Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012) or gabapentin (Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012; Vonsy, Ghandehari et al., 2009) are effective in reducing pain in this model, confirming inflammatory, nociceptive, and neuropathic component in experimental OA pain. Most of analgesic studies using the MIA model of OA were assessing not only nocifensive behaviors (such as withdrawal

thresholds), but also suppressed adaptive behaviors (such as weight bearing or locomotion) (Negus, Vanderah et al., 2006). Behavioral test indicating a PWT to von Frey filament tactile stimulation at intensities below those that provoke withdrawal in normal animals reflects the development of an animal equivalent to allodynia (Henry 2004). In our experiments, behavioral outcomes included the PWT sensory-reflexive method, assessing potential tactile allodynia (Bajaj, Bajaj et al., 2001; Farrell, Gibson et al., 2000; Vonsy, Ghandehari et al., 2009), the SWB kinetics as spontaneous measure of musculoskeletal pain, and the PEAP operant test, reflecting affective and cognitive dimensions of pain. All three methods had demonstrated interesting metric properties, but SWB was the least sensitive to detect IA lidocaine-induced analgesia in the rat MIA model (Otis, Gervais et al., 2016).

Our finding correlates with earlier reports (Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Im, Kim et al., 2010; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Janusz, Hookfin et al., 2001; Otis, Gervais et al., 2016; Pomonis, Boulet et al., 2005; Rahman, Bauer et al., 2009; Rahman, Patel et al., 2015; Thakur, Rahman et al., 2012; Vonsy, Ghandehari et al., 2009), where MIA-placebo rats displayed a persistent decrease in the ipsilateral PWT to stimulation with von Frey filament. MIA-placebo rats also showed a decrease of the weight applied to the ipsilateral hind limb as demonstrated in previous studies (Rahman, Patel et al., 2015; Otis, Gervais et al., 2016; Bove, Calcaterra et al., 2003; Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Pomonis, Boulet et al., 2005). Our results in an MIA model of OA induction showed temporary lesions, which were significantly noted at D3, and D7 (and D14), as previously demonstrated (Morais, Czezko et al., 2016; Fernihough, Gentry et al., 2004; Otis, Gervais et al., 2016). An important advance in operant behaviors is that these approaches may allow the detection and mechanistic investigation of spontaneous neuropathic or ongoing inflammatory/nociceptive (*i.e.*, non evoked) pain that is otherwise difficult to assess in nonverbal animals (Navratilova, Xie et al., 2013). Whereas in a previous experiment using MIA model of OA in rat, PEAP presented attractive metric properties (Otis, Gervais et al., 2016), it is uncertain why we did not reproduce similar alteration in the time spent in the dark side for the MIA-placebo group. It could be a statistical type-II error as, over the follow-up period, both pPGB (MIA-pPGB and sham-pPGB) groups presented a higher (albeit not statistically significant) number of times of presence in the dark side than both placebo (MIA-placebo and sham-placebo) groups (data not shown).

Interestingly, in previous reports, the injection of saline in the sham group was associated to a transient development of allodynia (D7, D14), and deterioration in the place escape/avoidance behavior (D3, D7) (Otis, Gervais et al., 2016) that was associated to a light increase in spinal CGRP at D21 (Otis, Gervais et al., 2016). The present study reproduced the development of allodynia (D14) in the sham-placebo group, and the observed increase in neuropeptides did not reach statistical significance.

As soon as 2005, Fernihough and colleagues reported an increased expression in lumbar (L4) dorsal root ganglion of CGRP-sensitive neurons in a rat MIA model of OA (Fernihough, Gentry et al., 2005). This result was confirmed by immunohistochemistry for SP and CGRP in the rat adjuvant-induced arthritis (Ahmed, Li et al., 2010), as well as in the rat MIA model at D21 (Ahmed, Li et al., 2012) and D31 (Ferreira-Gomes, Adaes et al., 2010). Lumbar spinal cord homogenate after OA induction with MIA injection (time-point not indicated) revealed an increase in CGRP, BK, glutamate, but not in SP, compared to naïve rats (Puttfarcken, Han et al., 2010). Our group determined that CGRP and SP up-regulation started at D7 and D28, respectively and dynorphin (1-32) down-regulation at D14 in spinal cord homogenate (Ferland, Pailleux et al., 2011). Chronic celecoxib improved gait parameters, relieved tactile allodynia, and reduced lumbar spinal concentration, collected at D21, in CGRP but not SP (Ferland, Pailleux et al., 2011). In the same MIA model in rat, eugenol, the main constituent of clove oil, induced functional analgesic benefits and decrease in both CGRP and SP (Ferland, Beaudry et al., 2012). In the present study, CGRP, BK and STT were soon up-regulated at D7, but not SP. However, the SP spinal concentration was increased too at D21. This reproduces the time-line up-regulation of nociceptive neuropeptides observed previously (Ferland, Pailleux et al., 2011). The increased expression in excitatory neurotransmitters, such as CGRP and SP, in central terminals of primary nociceptive afferents is associated with an activation of the peptidergic afferent C-fibers and facilitated transmission in sensitization state (Abaei, Sagar et al., 2016; Harvey and Dickenson 2009; Havelin, Imbert et al., 2016; Im, Kim et al., 2010; Otis, Gervais et al., 2016; Schuelert and McDougall 2006; Woolf 1996), such as the one induced by MIA joint injection (Bullock, Wookey et al., 2014; Otis, Gervais et al., 2016). Enhanced concentrations of spinal BK have been shown to augment primary afferent-evoked glutamatergic currents in the spinal cord, suggesting that, in addition to the documented role of BK in peripheral sensitization, it also plays a role in central sensitization (Puttfarcken, Han et

al., 2010). Interestingly, STT is recognised as a pain inhibitory neuromodulator and it was the only neuropeptide to distinguish a dose-effect of MIA injection in a previous study (Otis, Guillot et al., 2017), suggesting a higher involvement of the pain inhibitory pathway with the higher (2 mg) dose of MIA.

Because of alterations in the central nervous system and the peripheral nerves that innervate the joints, MIA-associated OA pain gradually develops the characteristics of neuropathic pain (Ivanavicius, Ball et al., 2007). Previous studies (Ivanavicius, Ball et al., 2007; Ferreira-Gomes, Adaes et al., 2012; Orita, Ishikawa et al., 2011; Thakur, Rahman et al., 2012) showed that activation of a marker of nerve injury in the lumbar (L5) dorsal root ganglion significantly increased between D3 and D14 post-MIA, and that NSAID analgesia peaked on D14 and decreased in efficacy thereafter (Ivanavicius, Ball et al., 2007). The presence of microgliosis (Orita, Ishikawa et al., 2011; Thakur, Rahman et al., 2012) and the concomitant up-regulation in growth-associated protein-43 in the ipsilateral dorsal root ganglion (Ferreira-Gomes, Adaes et al., 2012; Orita, Ishikawa et al., 2011) suggest that axonal injury is associated to a regeneration response. This indicates that the MIA model is presenting a transition at D3 – D14 from early inflammatory pain to late-stage inflammatory-neuropathic pain (Zhang, Ren et al., 2013). This might explain the complexity in OA pain treatment. Indeed, with the MIA model of OA in rats, it is interesting to note that almost all studies tested analgesic response to punctual (acute) administration of NSAID (Bove, Calcaterra et al., 2003; Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012; Pomonis, Boulet et al., 2005), morphine (Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Nagase, Kumakura et al., 2012; Pomonis, Boulet et al., 2005) and tramadol (Combe, Bramwell et al., 2004; Nagase, Kumakura et al., 2012), amitriptyline (Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012) or gabapentin (Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012). Therefore, the MIA model presented sensitivity to NSAID in the early inflammatory phase, at D3 (Fernihough, Gentry et al., 2004), up to D14 (Bove, Calcaterra et al., 2003), but not later (Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012; Pomonis, Boulet et al., 2005). Consistent analgesic results have only been obtained with chronic (repeated) dosing of the NSAID celecoxib (Ferland, Pailleux et al., 2011; Pomonis, Boulet et al., 2005), and acute (Combe, Bramwell et al., 2004; Fernihough, Gentry et al., 2004; Ivanavicius, Ball et al., 2007; Nagase, Kumakura et al., 2012; Pomonis, Boulet et al., 2005) or



chronic (repeated over 5 days) (Vonsy, Ghandehari et al., 2009) administration of opioids, amitriptyline and gabapentin.

The response to gabapentin was variable under acute treatment (Fernihough, Gentry et al., 2004; Nagase, Kumakura et al., 2012; Vonsy, Ghandehari et al., 2009), in contrast to repeated exposure (Vonsy, Ghandehari et al., 2009). Previous reports (Rahman, Bauer et al., 2009; Thakur, Rahman et al., 2012) tested positively to an acute administration of cPGB. Therefore, we opted in this experiment to test pre-emptive and curative posology of PGB with repeated administrations. The 30 mg/kg P.O. dosing was selected, based in the response to PGB in a rat model of spinal cord injury (Baastrup, Jensen et al., 2011). To summarize our results, pPGB medication provided strong analgesia according to spontaneous SWB, sensory-reflexive PWT and neuroproteomic pain assessment methods, but no effect was detected with operant evaluation. In curative conditions, some analgesia effects were detected with spontaneous SWB for morphine and carprofen, with sensory-reflexive PWT for morphine and cPGB, and were clearly evident with the use of neuropeptidomics. The PEAP operant testing presented no change over time for the majority of the groups. However, the cPGB- and morphine-treated rats respectively, attenuated and deteriorated the place escape/avoidance behavior.

It is interesting to note that the sham-pPGB group confirmed indirectly the nature of sham injection to be not entirely neutral. Compared to the sham-placebo group, pPGB inhibited the development of any tactile sensitivity and the concentration of the four spinal neuropeptides was lower, reaching statistical significance for SP and STT. In previous reports testing PGB analgesic effect (Rahman, Bauer et al., 2009; Thakur, Rahman et al., 2012), the latter response was much reduced in the MIA low dose (1 mg) or sham groups. Such apparent discrepancy could be explained by the different dosing regimen in PGB. However, gabapentinoid drugs, such as PGB, are significantly better able to modulate spinal innocuous and nociceptive transmission in models of neuropathy or other pain states than under physiological conditions (Bee and Dickenson 2008; Rahman, Bauer et al., 2009; Thakur, Rahman et al., 2012). Therefore, such result could also be interpreted as a mark of high sensitivity to detect analgesic response by the neuropeptidomics method.

We have also determined that the pPGB medication had a significant treatment effect, compared to the MIA-placebo group, on SWB and PWT, similar to the previously reported efficacy of repeated gabapentin administration in the MIA rat model (Vonsy, Ghandehari et al.,



2009). Moreover, the pPGB treatment effect was most evident on spinal neuropeptides at D7 (**Figure 32**) and D21 (**Figure 33**). There was also a trend of pPGB to increase its efficacy on spinal neuropeptides with time: At D7, pPGB counteracted the upregulation in nociceptive neuropeptides, but it was completely abolished at D21. In the second portion of this experiment, evidence of analgesics curative efficacy on functional behavioral outcomes was not so obvious, but carprofen showed effect on SWB, morphine on SWB and PWT (while deteriorating PEAP), and cPGB on PWT and PEAP. Once again, the treatment effect was most evident with neuroproteomics for the three analgesic treatments (**Figure 35**). The differences observed between the three analgesics on the functional outcomes are supported by different influences on neuropeptidomics. This highlights the interest of such complementary assessments in establishing the preclinical analgesic value of any test article.

These results are in line with the fact that PGB medication has an analgesic effect by decreasing neuropeptides release as a primary mechanism of PGB drug action (Micheva, Taylor et al., 2006; Takasusuki and Yaksh 2011). It is recognized that MIA is able to induce massive calcium influx in rat peripheral nerve *in vitro* via inhibition of metabolism (Schmidt and Dringen 2009; Petrescu, Micu et al., 2007) and in opposite, PGB may have roles in regulating vesicular neurotransmitter release *in vivo* by binding to the voltage-dependent calcium channel (Rahman, Patel et al., 2015). Moreover, nerve injury up-regulated  $\alpha_2\text{-}\delta\text{-1}$  expression in sensory neurons and the dorsal spinal cord that correlated with pain behaviors (Bauer, Rahman et al., 2010). This sustains why gabapentinoids are preferentially active in states of facilitated nociceptive processing (Partridge, Chaplan et al., 1998). As the spinal action of PGB is completed by an inhibition of descending facilitation (Rahman, Bauer et al., 2009), and the fact that the MIA-induced central sensitization is mediated, in part, by descending modulatory mechanisms (Havelin, Imbert et al., 2016), it could explain the major anti-allodynic and analgesic actions of PGB (Alles, Bandet et al., 2017; Stahl, Porreca et al., 2013) observed in this model.

### 2.5.7 Conclusions

In conclusion, our hypothesis that neuropeptidomic quantification in the spinal cord of the MIA model of OA was the most sensitive method to detect analgesics efficacy over than functional assessment of pain was confirmed. The objective to detect PGB pre-emptive and

curative analgesic effects with functional and neuroproteomic pain assessment methods was reached. Recently, Malfait & Little (Malfait and Little 2015) highlighted that many induced models of OA, particularly in rodents, are relatively rapidly progressive; thus there may be a limited window for differentiating prophylactic from therapeutic effects. This study demonstrates that the challenge can be met with complementary and sensitive outcome methods, such as functional neuropeptidomics.

### **2.5.8 Conflicts of interest**

This study was partly supported by a Collaborative Research and Development grant (#RDCPJ 491953–2016, supporting operations and salaries) in partnership with ArthroLab, Inc. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The Pfizer Canada sponsor was given the opportunity to review the manuscript and comment. There are no patents, products in development or marketed products to declare. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### **2.5.9 Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr Salma Ferchichi, Dr Daphnée Lecorre-Laliberté and Dr Julie Gervais for their technical assistance and active contribution to the success of the experiments. They would like to thank the ArthroLab personnel for their professionalism and support.

### **2.5.10 Funding**

This work was supported by Discovery grants (#441651-2013; Eric Troncy – #386637-2010; Francis Beaudry) supporting salaries, and a Collaborative Research and Development grant (#RDCPJ 491953–2016; Eric Troncy, in partnership with ArthroLab Inc.) supporting operations and salaries, from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, as well as by an ongoing New Opportunities Fund grant (#9483; Eric Troncy), a Leader Opportunity Fund grant (#24601; Eric Troncy), supporting pain/function equipment from the Canada Foundation for Innovation, and the Chair in Osteoarthritis of the Université de Montréal. This study was funded by a Pfizer Neuropathic Pain research award (#WS386180; Eric Troncy) from Pfizer Canada, Inc.

## 2.5.11 References

- Abaei M, Sagar DR, Stockley EG, et al. (2016) Neural correlates of hyperalgesia in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain. *Mol Pain* 12.
- Ahmed AS, Li J, Ahmed M, et al. (2010) Attenuation of pain and inflammation in adjuvant-induced arthritis by the proteasome inhibitor MG132. *Arthritis Rheum* 62: 2160-9.
- Ahmed AS, Li J, Erlandsson-Harris H, et al. (2012) Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. *Pain* 153: 18-26.
- Alles SR, Bandet MV, Eppler K, et al. (2017) Acute anti-allodynic action of gabapentin in dorsal horn and primary somatosensory cortex: Correlation of behavioural and physiological data. *Neuropharmacology* 113: 576-90.
- Baastrup C, Jensen TS and Finnerup NB (2011) Pregabalin attenuates place escape/avoidance behavior in a rat model of spinal cord injury. *Brain Res* 1370: 129-35.
- Bajaj P, Bajaj P, Graven-Nielsen T, et al. (2001) Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental controlled study. *Pain* 93: 107-14.
- Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, et al. (2007) Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 1190-8.
- Bauer CS, Rahman W, Tran-van-Minh A, et al. (2010) The anti-allodynic alpha(2)delta ligand pregabalin inhibits the trafficking of the calcium channel alpha(2)delta-1 subunit to presynaptic terminals in vivo. *Biochem Soc Trans* 38: 525-8.
- Beaudry F, Ferland CE and Vachon P (2009) Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 23: 940-50.
- Bee LA and Dickenson AH (2008) Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin. *Pain* 140: 209-23.
- Berger JV, Knaepen L, Janssen SP, et al. (2011) Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res Rev* 67: 282-310.

- Beswick AD, Wylde V, Gooberman-Hill R, et al. (2012) What proportion of patients report long-term pain after total hip or knee replacement for osteoarthritis? A systematic review of prospective studies in unselected patients. *BMJ Open* 2: e000435.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, et al. (2003) Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 821-30.
- Bove SE, Flatters SJ, Inglis JJ, et al. (2009) New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev* 60: 187-201.
- Boyce-Rustay JM, Zhong C, Kohnken R, et al. (2010) Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology* 58: 537-43.
- Bullock CM, Wookey P, Bennett A, et al. (2014) Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheumatol* 66: 2188-200.
- Combe R, Bramwell S and Field MJ (2004) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett* 370: 236-40.
- Cook JL, Hung CT, Kuroki K, et al. (2014) Animal models of cartilage repair. *Bone Joint Res* 3: 89-94.
- Cruz-Almeida Y and Fillingim RB (2013) Can Quantitative Sensory Testing Move Us Closer to Mechanism-Based Pain Management? *Pain Medicine* DOI: 10.1111/pme.12230.
- Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, et al. (2004) Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *European Journal of Neuroscience* 20: 1566-76.
- Dooley DJ, Donovan CM, Meder WP, et al. (2002) Preferential action of gabapentin and pregabalin at P/Q-type voltage-sensitive calcium channels: inhibition of K<sup>+</sup>-evoked [3H]-norepinephrine release from rat neocortical slices. *Synapse* 45: 171-90.
- Dooley DJ, Mieske CA and Borosky SA (2000) Inhibition of K<sup>(+)</sup>-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neuroscience Letters* 280: 107-10.
- Farrell M, Gibson S, McMeeken J, et al. (2000) Pain and hyperalgesia in osteoarthritis of the hands. *Journal of Rheumatology* 27: 441-7.

- Fehrenbacher JC, Taylor CP and Vasko MR (2003) Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. *Pain* 105: 133-41.
- Ferland CE, Beaudry F and Vachon P (2012) Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. *Phytother Res* 26: 1278-85.
- Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, et al. (2011) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 603-10.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, et al. (2011) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45: 423-9.
- Fernihough J, Gentry C, Bevan S, et al. (2005) Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci Lett* 388: 75-80.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. (2004) Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112: 83-93.
- Ferreira-Gomes J, Adaes S, Sarkander J, et al. (2010) Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis Rheum* 62: 3677-85.
- Ferreira-Gomes J, Adaes S, Sousa RM, et al. (2012) Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. *Mol Pain* 8: 50.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 14: 162-73.
- Fuchs PN and McNabb CT (2012) The place escape/avoidance paradigm: a novel method to assess nociceptive processing. *J Integr Neurosci* 11: 61-72.
- Gervais JA, Otis C, Lussier B, et al. (2018) Osteoarthritic pain model influences pain spinal neuropeptidomics and functional phenotype: A pilot study in female rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, et al. (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 40: 1670-9.

- Guzman RE, Evans MG, Bove S, et al. (2003) Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31: 619-24.
- Harvey VL and Dickenson AH (2009) Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain* 5: 18.
- Havelin J, Imbert I, Cormier J, et al. (2016) Central Sensitization and Neuropathic Features of Ongoing Pain in a Rat Model of Advanced Osteoarthritis. *J Pain* 17: 374-82.
- Henry JL (2004) Molecular events of chronic pain: from neuron to whole animal in an animal model of osteoarthritis. *Novartis Found Symp* 260: 139-45; discussion 45-53, 277-9.
- Hinton R, Moody RL, Davis AW, et al. (2002) Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. *American Family Physician* 65: 841-8.
- Hunter DJ, McDougall JJ and Keefe FJ (2008) The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 34: 623-43.
- Im HJ, Kim JS, Li X, et al. (2010) Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* 62: 2995-3005.
- Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, et al. (2007) Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128: 272-82.
- Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, et al. (2001) Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 751-60.
- King DP, Vierck CJ, Rodgers J, et al. (2003) Differential effects of stress on escape and reflex responses to nociceptive thermal stimuli in the rat. *Brain Research* 987: 214-222.
- Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, et al. (2016) Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res* 11: 19.
- Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, et al. (2013) Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*.
- Lavand'homme P and Thienpont E (2015) Pain after total knee arthroplasty: a narrative review focusing on the stratification of patients at risk for persistent pain. *Bone Joint J* 97-B: 45-8.

- Li JX (2013). The application of conditioning paradigms in the measurement of pain. *Eur J Pharmacol* 716: 158-168.
- Little CB and Zaki S (2012) What constitutes an "animal model of osteoarthritis"--the need for consensus? *Osteoarthritis Cartilage* 20: 261-7.
- Malfait AM and Little CB (2015) On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 17: 225.
- Maneuf YP, Hughes J and McKnight AT (2001) Gabapentin inhibits the substance P-facilitated K(+)-evoked release of [(3)H]glutamate from rat caudial trigeminal nucleus slices. *Pain* 93: 191-6.
- Mangaiarkkara A, Rameshkannan S and Ali RM (2015). Effect of Gabapentin and Pregabalin in Rat Model of Taxol Induced Neuropathic. *Pain J Clin Diagn Res* 9: FF11-14.
- Marker CL and Pomonis JD (2012) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol Biol* 851: 239-48.
- Mauderli AP, Acosta-Rua A and Vierck CJ (2000). An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods* 97: 19-29.
- McCoy AM (2015) Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol* 52: 803-18.
- Micheva KD, Taylor CP and Smith SJ (2006) Pregabalin reduces the release of synaptic vesicles from cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 70: 467-76.
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10: 283-94.
- Morais SV, Czezko NG, Malafaia O, et al. (2016) Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. *Acta Cir Bras* 31: 765-73.
- Nagase H, Kumakura S and Shimada K (2012) Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65: 29-36.
- Navratilova E, Xie JY, King T, et al. (2013) Evaluation of reward from pain relief. *Ann N Y Acad Sci* 1282: 1-11.
- Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, et al. (2006) Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 507-14.



- Nwosu LN, Mapp PI, Chapman V, et al. (2016) Relationship between structural pathology and pain behaviour in a model of osteoarthritis (OA). *Osteoarthritis Cartilage* 24: 1910-17.
- Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, et al. (2011) Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 134.
- Otis C, Gervais J, Guillot M, et al. (2016) Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. *Arthritis Res Ther* 18: 150.
- Otis C, Guillot M, Moreau M, et al. (2017) Spinal neuropeptide modulation and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Neuropeptides*.
- Partridge BJ, Chaplan SR, Sakamoto E, et al. (1998) Characterization of the effects of gabapentin and 3-isobutyl-gamma-aminobutyric acid on substance P-induced thermal hyperalgesia. *Anesthesiology* 88: 196-205.
- Petrescu N, Micu I, Malek S, et al. (2007) Sources of axonal calcium loading during in vitro ischemia of rat dorsal roots. *Muscle Nerve* 35: 451-7.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114: 339-46.
- Puttfarcken PS, Han P, Joshi SK, et al. (2010) A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydro naphthalen-2-ol], a novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain* 150: 319-26.
- Rahman W, Bauer CS, Bannister K, et al. (2009) Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 5: 45.
- Rahman W, Patel R and Dickenson AH (2015) Electrophysiological evidence for voltage-gated calcium channel 2 (Cav2) modulation of mechano- and thermosensitive spinal neuronal responses in a rat model of osteoarthritis. *Neuroscience* 305: 76-85.
- Rialland P, Otis C, de Courval ML, et al. (2014) Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospective, blinded, randomized, and controlled study focusing on spinal pain proteomics. *J Dairy Sci* 97: 2118-34.



- Rialland P, Otis C, Moreau M, et al. (2014) Association between sensitisation and pain-related behaviours in an experimental canine model of osteoarthritis. *Pain* 155: 2071-9.
- Roughan JV and Flecknell PA (2001) Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90, 65-74.
- Sandkuhler J (2009) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological Reviews* 89: 707-58.
- Schaible HG (2012) Mechanisms of chronic pain in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 14: 549-56.
- Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, et al. (2009) Joint pain. *Experimental Brain Research* 196: 153-62.
- Schmidt MM and Dringen R (2009) Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics* 1: 1.
- Schuelert N and McDougall JJ (2006) Electrophysiological evidence that the vasoactive intestinal peptide receptor antagonist VIP6-28 reduces nociception in an animal model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1155-62.
- Stahl SM, Porreca F, Taylor CP, et al. (2013) The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? *Trends Pharmacol Sci* 34: 332-9.
- Takasusuki T and Yaksh TL (2011) The effects of intrathecal and systemic gabapentin on spinal substance P release. *Anesth Analg* 112: 971-6.
- Thakur M, Rahman W, Hobbs C, et al. (2012) Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One* 7: e33730.
- Thote T, Lin AS, Raji Y, et al. (2013) Localized 3D analysis of cartilage composition and morphology in small animal models of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1132-41.
- van Hooft JA, Dougherty JJ, Endeman D, et al. (2002) Gabapentin inhibits presynaptic Ca(2+) influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex. *European Journal of Pharmacology* 449: 221-28.

- Vermeirsch H, Biermans R, Salmon PL, et al. (2007) Evaluation of pain behavior and bone destruction in two arthritic models in guinea pig and rat. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 349-59.
- Vierck RH and Wiley RG (2003). Intrathecal substance p-saporin attenuates operant escape from nociceptive thermal stimuli. *Neuroscience* 119: 223-232.
- Vonsy JL, Ghandehari J and Dickenson AH (2009) Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. *Eur J Pain* 13: 786-93.
- Woolf CJ (1996) Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* 66: 105-8.
- Woolf CJ and Thompson SW (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44: 293-9.
- Zhang RX, Ren K and Dubner R (2013) Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1308-15.
- Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, et al. (2010) OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and Cartilage* 18: 476-99.
- Zhang XJ, Zhang TW, Hu SJ, et al. (2011) Behavioral assessments of the aversive quality of pain in animals. *Neurosci Bull* 27: 61-7.

## **2.6 Osteoarthritic pain model influences pain spinal neuropeptidomics and functional phenotype: A pilot study in female rats**

Cet article, soumis dans *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, a permis d'évaluer les conséquences de différents modèles d'induction d'arthrose chez le rat sur les mesures d'évaluation fonctionnelle de la douleur et les concentrations des neuropeptides spinaux. Le but de cette étude pilote était d'évaluer et de comparer trois procédures chirurgicales d'induction d'arthrose articulaire chez le rat avec le modèle chimique sur les différents outils de mesure de la douleur.

Les résultats de cette étude montrent que le modèle chirurgical de combinaison entraîne des changements de douleur plus persistants et progressifs en comparaison avec le modèle chimique, ce qui pourrait représenter mieux l'arthrose post-traumatique, mais tous les deux ont produit de façon égale une libération accrue de neuropeptides pro-nociceptifs et anti-nociceptifs à différents moments.

Mme Colombe Otis a participé à la conception du schéma expérimental, aux manipulations des rongeurs, à l'exécution des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur et neuroprotéomiques, à l'acquisition et aux traitements des données puis elle a assisté le Dr Guillot pour les analyses statistiques de ces dernières. Pour la rédaction de cet article, Mme Otis était premier co-auteur avec Dre Gervais, dont cet article faisait partie aussi de ses travaux de recherches de son mémoire, mais les deux étudiantes ont participé de façon égale à cette étude. Dre Gervais était principalement en charge du développement et de l'exécution des méthodologies concernant les inductions chirurgicales d'arthrose. Pour l'article, Mme Otis a pour sa part participé activement à sa rédaction, à la recherche littéraire, à l'infographie de toutes les figures et tableaux de l'ensemble du manuscrit. Elle a également modifié et enrichi l'article suite aux commentaires par les réviseurs afin que ce manuscrit soit bonifié et re-soumis pour publication.

Julie Anne Gervais<sup>1¶</sup>, Colombe Otis<sup>1¶</sup>, Bertrand Lussier<sup>2,3</sup>, Martin Guillot<sup>1</sup>, Francis Beaudry<sup>1,3</sup>, Martel-Pelletier Johanne<sup>3</sup>, Pelletier Jean-Pierre<sup>3</sup>, Eric Troncy<sup>1,3</sup>

### **2.6.1 Abstract**

Osteoarthritis, the leading cause of chronic joint pain, is studied through different animal models, but none of them are ideal in terms of reliability and translational value. Three surgical models of osteoarthritic pain, *i.e.* destabilization of the medial meniscus, cranial cruciate ligament transection and the combination of both, and one chemical (intra-articular injection of monosodium iodoacetate) models were compared in this pilot study in female rats for their consequences on pain functional outcomes (static weight-bearing, punctate tactile paw withdrawal threshold) and spinal neuropeptides (substance P, calcitonin gene-related peptide, bradykinin, and somatostatin). Six rats were assigned to each model group and a Sham group. Both the monosodium iodoacetate and surgical combination models induced functional alterations in static weight-bearing and punctate tactile paw withdrawal threshold, the changes being more persistent in the surgical combination group. Both also produced an increased release of pro-nociceptive and anti-nociceptive neuropeptides at different time-points. Comparison with the monosodium iodoacetate model showed the interest of a surgical model, especially the combination of destabilization of the medial meniscus and cranial cruciate

---

<sup>1</sup> Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec (GREPAQ) – Department of veterinary biomedicine, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, St.-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada

<sup>2</sup> Department of clinical sciences, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, St.-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada

<sup>3</sup> Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Pavillon R, Montreal (QC), H2X 0A9 Canada

¶ Both authors contributed equally to this work, and as such must be considered as first co-authors

ligament transection, whereas single surgical inductions led to temporary functional alterations and no change in neuropeptidomics.

### **2.6.2 Keywords**

Chronic pain, Preclinical model, Surgical, Chemical, Monosodium iodoacetate, Functional assessment, Proteomics.

### **2.6.3 Introduction**

Pain due to osteoarthritis (OA) is one of the most frequent causes of chronic pain, causing tremendous decreases in productivity and economic losses (Breivik, Collett et al., 2006). OA is also the most common chronic degenerative disease affecting pet animals in occidental societies (Shearer 2011; Slingerland, Hazewinkel et al., 2011).

Different animal models have been employed for the investigation of pain mechanisms and evaluation of potential treatments. The ideal animal model should be reliable, valid and offer the best translational value possible (Bendele 2001; Little and Smith 2008). In rats, often the intra-articular (IA) injection of monosodium iodoacetate (MIA) is used for the evaluation of analgesic OA therapies. It relies on the disruption of chondrocyte glycolysis, causing an interruption in their metabolism and subsequent cartilage damage (Guzman, Evans et al., 2003; Kobayashi, Imaizumi et al., 2003; Pomonis, Boulet et al., 2005). The pathology develops very rapidly, and dose-dependent structural alterations have been described (Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; for review, see Schaible 2013; Eitner, Hoffmann et al., 2017) to plateauing at week 4 post-IA injection for high ( $\geq 0.5$  mg) doses of MIA (Udo, Muneta et al., 2016). On functional outcomes, weight-bearing changes (Pomonis, Boulet et al., 2005) and centralized pain (manifested as tactile hypersensitivity, electrophysiological or markers of neuronal hyperactivity, spinal proteomics, *etc.*) have been documented (Ferland, Laverty et al., 2011a; Fernihough, Gentry et al., 2004; Im, Kim et al., 2010; Zhang, Ren et al., 2013). Unfortunately, on weight-bearing the MIA model causes waxing and waning changes over the first four weeks post-IA injection, in our experience (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017) and in a non-exhaustive review for 70.6 % of 34 publications using various MIA doses/volumes in rats. The rapidly developing MIA model is clearly different from slowly developing natural OA, its transience often limits the assessment at one (14 days post-MIA dosing) time-point

(Hummel and Whiteside 2017), it displays in gene arrays substantial differences from human OA (Barve, Minnerly et al., 2007), and relies on a disease mechanism different from natural OA, which could limit the predictability of therapeutic effect of analgesics. In addition, or alternatively, models of joint destabilization are used in dog, sheep, rabbits, and guinea pigs, and in particular for pain research also in rodents. Until now, none of the surgical models in rats have satisfied all the desired criteria of reliability (reproducibility, repeatability), face, construct (sensitive, specific to OA, responsive to treatment) and predictive validity, and translational value (Bendele 2001; Bove, Laemont et al., 2006; Ferland, Lavery et al., 2011a; Fernihough, Gentry et al., 2004; Hayami, Pickarski et al., 2006; Iijima, Aoyama et al., 2014; Iijima, Aoyama et al., 2016a; Iijima, Aoyama et al., 2016b; Little and Zaki 2012; Mapp, Sagar et al., 2013; Tsai, Chen et al., 2018).

This pilot study was performed with the goal of evaluating pain functional outcomes and spinal neuropeptides in three surgical rat models of OA pain, *i.e.* destabilization of the medial meniscus (DMM), cranial cruciate ligament transection (CCLT) and the combination of both (COMBO) and comparing those results to the well-established MIA model.

The research hypothesis was that surgical OA induction would be accompanied by quantifiable neurophysiological modifications compatible with the presence of chronic non-physiologic pain.

## **2.6.4 Materials and methods**

### **2.6.4.1 Animals**

The study protocol was approved by the Université de Montréal Animal Care and Use Committee (No. rech-1766), in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. Female Sprague-Dawley rats ( $n = 30$ ) were obtained from Charles River Canada (St.-Constant, Québec, Canada). Mean  $\pm$  standard deviation body weight was  $393 \pm 37$  g and ages ranged from four to six months old (skeletal maturity). The study was conducted at ArthroLab Inc. (Saint-Basile-le-Grand, Québec, Canada) in a standardized environment and with routine maintenance (including two rats per cage with toys, cardboard boxes, pipes, and fruit crunchy treats) according to ArthroLab Inc. (SOP AC7011-3).

#### *2.6.4.1.1 Group description*

Rats ( $n = 6$  per group) were randomly (blocks design) assigned to one of the five treatment groups that included three different surgical OA models, one Sham surgical model and one MIA model. Groups were as follows: (1) Sham; (2) DMM; (3) CCLT; (4) COMBO for the combination of DMM and CCLT rats; and (5) MIA.

#### **2.6.4.2 Induction of OA**

##### *2.6.4.2.1. Anesthesia and analgesia*

For the four surgical groups, on day (D) 0, 1.0 mg/kg of buprenorphine (Buprenorphine SR®, Chiron Compounding Pharmacy Inc., Guelph, ON, Canada) was administered intramuscularly as premedication, anesthesia was induced, 40 minutes later, with isoflurane (IsoFlo®, Abbott Animal Health, Montreal, Québec, Canada) in O<sub>2</sub> in an induction box and maintained with 2 % isoflurane in O<sub>2</sub> mixture with a face mask. At the end of the surgical procedures, an incisional periarticular block of bupivacaine 0.25 % (Marcaine®, McKesson Canada, St.-Laurent, Québec, Canada) at a dose of 0.05-0.1 mL per stifle ( $< 1$  mg/kg) was performed. For the MIA group, similar procedure was conducted, with the exception of the periarticular bupivacaine block. Based on manufacturer label, the Sustained-Release opioid-based analgesia duration is expected to stay for 72 hours.

##### *2.6.4.2.2 Intra-articular MIA injection*

In the subjects of the MIA group, an IA injection of 2 mg of MIA (Sigma-Aldrich, St.-Louis, MO, USA) dissolved in 50  $\mu$ L of 0.9 % sterile saline was performed through the right infrapatellar ligament using a previously described technique (Fernihough, Gentry et al., 2004; Guingamp, Gegout-Pottie et al., 1997; Otis, Gervais et al., 2016; Vermeirsch, Biermans et al., 2007).

##### *2.6.4.2.3 Surgical procedures*

All procedures were performed on the right stifle following preparation for aseptic surgical technique. For the surgical groups, a medial skin incision followed by a medial

parapatellar arthrotomy was used. The patella was luxated laterally, the pertinent articular structures were identified and the designated procedure was performed. Then, the patella was anatomically reduced and the surgical site closure was performed in three successive planes using 5-0 polyglactin 910 (Vicryl®, Ethicon, Somerville, NJ, USA). In the subjects of the Sham group, all IA structures were left intact after the arthrotomy. In the animals of the DMM group, the medial cranial meniscotibial ligament was identified and transected using a #15 blade as previously described in mice (Glasson, Blanchet et al., 2007). Spontaneous caudomedial retraction of the medial meniscus was observed, proof of complete transection of the ligament. In the rats of the CCLT group, the cranial cruciate ligament was transected with a #11 blade as previously described (Williams, Felten et al., 1982) and the complete transection was confirmed by cranial drawer motion. In the subjects of the COMBO group, first the DMM was performed followed by the CCLT.

#### **2.6.4.3 Functional evaluations**

Rats were acclimatized to the evaluation environments at D-14, D-7, D-5 and D-3, spending five to ten minutes in each of the two apparatus used for functional pain assessment, according to a recent validation in rats (Otis, Gervais et al., 2016). Assessment time-points differed between the surgical groups (D-1 = baseline, D14, D28 and D42) and the MIA group (D-1 = baseline, D3, D7, D14 and D21). Selected functional pain assessment methods have been recently determined as reliable (reproducible, repeatable), sensitive to OA pain detection and (partially) responsive to IA lidocaine treatment in rats using the MIA model (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017). Both functional evaluation observers were ladies, and completely blinded to OA induction, and experimental design.

The weight distribution through the right and left stifle was assessed using an Incapacitance Meter® (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) to measure static weight-bearing (SWB) distribution in the two hind limbs as previously published (Otis, Gervais et al., 2016). The force exerted by each hind limb was measured and analyzed in grams, but reported in percentage of total body weight (% BW) to normalize the data. Rats were allowed to acclimate to the testing apparatus and when stationary, readings were taken over a 3-s period. Triplicates were taken simultaneously for each limb at each time point.



Then, tactile sensitivity was assessed using the Electronic von Frey anesthesiometer® (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) with a standardized filament (0.7 mm<sup>2</sup> polypropylene Supertip) to obtain punctate tactile paw withdrawal threshold (PWT). Rats were placed in a cage with a grill floor on an elevated stand and allowed to acclimatize for one minute. The operator then applied the filament with continuous progressive pressure to the center of the plantar surface of the paw until the animal lifted the paw. Both hind paws were tested three times, in a random order, and with a refractory period of one minute between each trial (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017).

#### **2.6.4.4 Euthanasia and spinal cord collection**

Euthanasia was performed by decapitation following isoflurane overdose (after the last functional evaluation day, D21 for the MIA and D42 for the surgical groups) after which collection of the whole spinal cord was achieved by a saline flush technique (Ferland, Pailleux et al., 2011b; Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017). Samples were snap frozen in cold hexane, stored individually and kept at -80°C pending neuropeptidomic analysis.

#### **2.6.4.5 Neuropeptidomics**

Central sensitization mechanisms include various biochemical processes such as increased spinal release of neurotransmitters and neuromodulators, as well as an increased excitability of postsynaptic neurons. Recently, spinal release of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) was detected in the MIA-induced OA pain model in rats (Ferland, Pailleux et al., 2011b; Kobayashi, Imaizumi et al., 2003; Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017). In the present study, SP, CGRP, bradykinin (BK) and somatostatin (SST) were analyzed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry and expressed in fmol/mg of whole spinal cord homogenates (1:5 w/v in 0.25 % TFA solution) according to a previously described technique (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017).

#### **2.6.4.6 Statistical analysis**

The % BW and PWT data were expressed as the average of each paw measure in triplicate. The symmetry index was used only to statistically confirm the impressions given by the graphs, when necessary.

The normality of the data (Shapiro-Wilk test) and the homogeneity of variance were confirmed using the absolute values of the residuals of the mixed model, when appropriate. Unless indicated otherwise, hypotheses were two-sided and alpha-value was set at 0.05. For each model, the first tested hypothesis was that there was at least one evaluation day when the outcome was different from the baseline. Based on the changes observed with the MIA rat model, pre-test analyses for a limited sample size ( $n = 6$ ) conducted to a power  $> 89.1\%$  for SWB, and  $> 81.4\%$  for PWT to detecting a significant within-time (intra-group) difference compared to baseline (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017). A linear mixed model for repeated measures was used. Multiple comparisons were performed using the Dunnett procedure. Then, the surgical models that presented a significant change over time were compared (the MIA model was excluded for inter-group testing because of its different time-points of assessment).

The second hypothesis was that at least one model differed. Pre-test power analyses for inter-group difference with such sample size were low ( $< 30\%$ ). The alpha-value was set at 0.1 at that time to maximize the chances of significant results in a comparative pilot study setting. It is acceptable to set a higher alpha value, when the goal of the study is to find an effect that could lead to a promising scientific discovery. This allows to increase the power and consequently decrease the risk of Type II error, but it also increases the chances of making a Type I error (*i.e.*, saying there is a difference when there is not) (Curran-Everett and Benos 2004). Data were processed using a linear mixed model for repeated measures, except for the neuropeptides data, which were analyzed with the unpaired exact Wilcoxon test following a non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. Tukey adjustment was used to obtain adjusted (adj)-*P*-values for multiple comparisons.

## 2.6.5 Results

All animals lived until the day of euthanasia and there were no significant complication following the surgical procedures or IA injections. The % BW and PWT data of one rat of the CCLT group were excluded from statistical analyses due to non-relevant baseline values. Collection of the spinal cord was unsuccessful in one rat of the MIA group.

### 2.6.5.1 Functional evaluations

The values from all groups except for DMM rats, presented a significant change over time for the right hind limb (RHL) % BW (**Tableau XVII**).

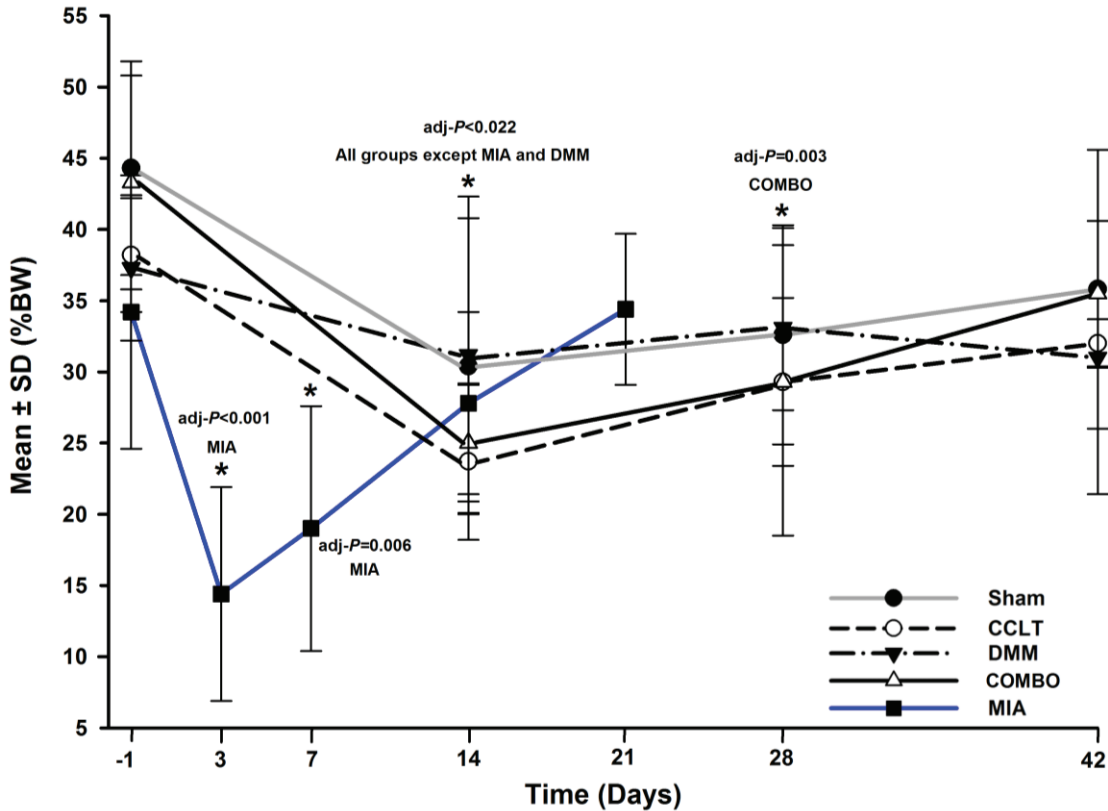
**Tableau XVII. Testing time effect and specific comparison vs. baseline of the static weight-bearing for the right hind limb.**

Experimental groups	Type III test of fixed effects ProbF	Day	Adjusted <i>P</i> -value (differences of least squares mean, standard error)
Sham	<b>0.041</b>	14	<b>0.022</b> (-13.93, 4.61)
CCLT	<b>0.028</b>	14	<b>0.006</b> (-14.49, 2.98)
DMM	0.599		
COMBO	<b>&lt;0.001</b>	14	<b>&lt;0.001</b> (-18.33, 2.83)
		28	<b>0.003</b> (-14.01, 3.60)
MIA	<b>&lt;0.001</b>	3	<b>&lt;0.001</b> (-19.74, 4.11)
		7	<b>0.006</b> (-15.17, 4.19)

For each group, the best structure of the covariance model was assessed using a graphical method (plots of covariance vs. lag in time between pairs of observation compared to different covariance model), and using information criteria that measure the relative fit of competing covariance model: normal distribution, compound symmetry covariance structure (Sham, DMM and MIA groups); heterogeneous compound symmetry covariance structure (CCLT group), and type-1 auto regressive covariance structure (COMBO group). For the baseline to specific day comparison, adjusted *P*-value for multiple comparisons was obtained using the Dunnett procedure. A bold font highlights a significant difference. Surgical models, CCLT: cranial cruciate ligament transection; DMM: destabilization of the medial meniscus; COMBO: combination of both CCLT and DMM; chemical model, MIA: monosodium iodoacetate.

Values decreased for all other groups at the second evaluation time-point and tended to increase afterwards (**Figure 36**). Within the surgical models, only the COMBO model data were still significantly lower than the baseline values at D28 (**Tableau XVII**). A Type III-day effect was noted ( $P = 0.004$ ) for the surgical models, no group effect, and this indicated that globally, an alteration in the % BW of the RHL was detected over time but the analysis was not sensitive enough to detect the apparently more severe change in the COMBO group (**Figure 36**). Interestingly, there was an increase in the % BW of the left (non-affected) hind limb in the MIA group at D3 and D7 and the asymmetric SWB distribution confirmed a significant weight shift

to the left side for these time-points ( $P < 0.001$ ). In the surgical groups, this phenomenon was not observed, and the SWB symmetric distribution was not significantly different from baseline.



**Figure 36. Percentage body weight (%BW) (mean ± standard deviation) of the right hind limb for the static weight-bearing by day (D).**

Time is distributed differently for the surgical (D-1, D14, D28 and D42) and the MIA (D-1, D3, D7, D14, D21) groups. A star indicates a day when there is a statistically significant decreased value compared to its baseline (see **Table XVI** for details).

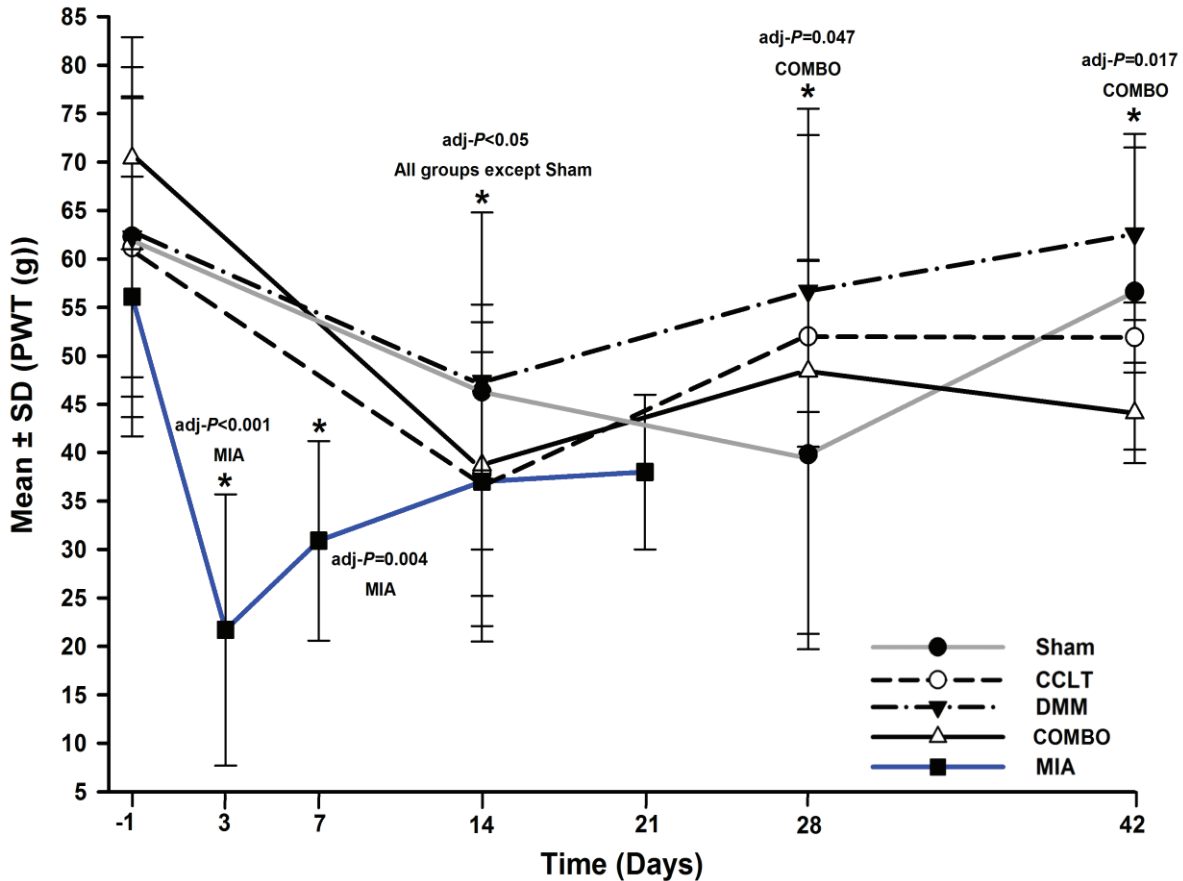
For the right hind paw (RHP) PWT, changes in time were significant for all groups except the Sham group (**Tableau XVIII**).

**Tableau XVIII. Testing time effect and specific comparison vs. baseline of the paw withdrawal threshold for the right hind paw.**

Experimental Groups	Type III test of fixed effects ProbF	Day	Adjusted <i>P</i> -value (differences of least squares mean, standard error)
Sham	0.061		
CCLT	<b>0.036</b>	14	<b>0.014</b> (-23.47, 6.90)
DMM	<b>0.049</b>	14	<b>0.043</b> (-14.81, 5.52)
COMBO	<b>0.009</b>	14	<b>0.005</b> (-31.64, 8.32)
		28	<b>0.047</b> (-21.97, 7.96)
		42	<b>0.017</b> (-26.26, 8.14)
MIA	<b>&lt;0.001</b>	3	<b>&lt;0.001</b> (-34.34, 5.68)
		7	<b>0.004</b> (-25.20, 6.83)
		14	<b>0.049</b> (-19.07, 7.29)

For each group, the best structure of the covariance model was assessed using a graphical method (plots of covariance vs. lag in time between pairs of observation compared to different covariance model), and using information criteria that measure the relative fit of competing covariance model: normal distribution, compound symmetry covariance structure (Sham, CCLT, DMM, COMBO and MIA groups). For the baseline to specific day comparison, adjusted *P*-value for multiple comparisons was obtained using the Dunnett procedure. A bold font highlights a significant difference. Surgical models, CCLT: cranial cruciate ligament transection; DMM: destabilization of the medial meniscus; COMBO: combination of both CCLT and DMM; chemical model, MIA: monosodium iodoacetate.

Values decreased for all other groups at the second evaluation time-point and tended to increase afterwards (**Figure 37**).



**Figure 37. Paw withdrawal threshold (PWT) (mean ± standard deviation) of the right hind paw by day (D).**

Time is distributed differently for the surgical (D-1, D14, D28 and D42) and the MIA (D-1, D3, D7, D14, D21) groups. A star indicates a day when there is a statistically significant decreased value compared to its baseline (see **Tableau XVIII** for details).

The COMBO group continued to show a significantly persistent decrease in RHP PWT values until the last evaluation day (**Tableau XVIII**). A Type III effect of the day ( $P = 0.014$ ) and group ( $P = 0.064$ ) was present when surgical models were compared using normal distribution compound symmetry with heterogeneous day covariance structure mixed model. This indicated that globally, an alteration in PWT was detected over time and the statistical analysis was sensitive enough to detect a larger alteration in the COMBO group than in the DMM group ( $P = 0.053$ ). Interestingly, the difference ( $P$ ) between groups was not significant for the COMBO when compared to the CCLT and Sham groups (**Figure 37**). There was a simultaneous increase in the PWT of the left hind paw and decrease of PWT of the RHP on D14 for the DMM group and on D3 and D7 for the MIA group. The asymmetric distribution of

the PWT showed a significant weight shift to the left side at D3 and D7 ( $P < 0.001$ ) for the MIA group only. In the surgical groups, this was not observed and the PWT symmetry distribution was not significantly different from baseline.

### 2.6.5.2 Biomarkers

Compared to the COMBO group, all other surgical groups presented significantly lower values for CGRP (Sham adj- $P = 0.002$ ; CCLT adj- $P = 0.007$ ; DMM adj- $P < 0.001$ ) (**Tableau XIX**). The concentration of SST in the COMBO group was significantly higher compared to Sham and CCLT groups (adj- $P = 0.088$  and  $0.017$ , respectively). The spinal concentrations of SP and BK presented a Type-III significant group effect ( $P = 0.095$ , and  $0.028$ , respectively), but the analysis was not sensitive enough to detect the difference between surgical groups. Values of all neuropeptides, except SP ( $P = 0.476$ ), were significantly higher in the MIA model compared to the COMBO group (adj- $P < 0.02$ ).

**Tableau XIX. Between-groups comparison of neuropeptide spinal concentrations in surgical and chemical models of osteoarthritis pain in rats.**

Experimental Groups	N	Neuropeptides (fmol/mg)			
		SP	CGRP	BK	SST
Sham	6	112 ± 12 <sup>a</sup>	569 ± 42 <sup>a</sup>	213 ± 15 <sup>a</sup>	339 ± 23 <sup>a</sup>
CCLT	6	118 ± 18 <sup>a</sup>	593 ± 58 <sup>a</sup>	183 ± 15 <sup>a</sup>	325 ± 28 <sup>a</sup>
DMM	6	104 ± 16 <sup>a</sup>	546 ± 42 <sup>a</sup>	191 ± 14 <sup>a</sup>	351 ± 23 <sup>a,b</sup>
COMBO	6	135 ± 31 <sup>a</sup>	<b>725 ± 105 <sup>b</sup></b>	195 ± 20 <sup>a</sup>	<b>379 ± 45 <sup>b</sup></b>
MIA	5	147 ± 11 <sup>a</sup>	<b>1065 ± 153 <sup>c</sup></b>	<b>354 ± 12 <sup>b</sup></b>	<b>722 ± 44 <sup>c</sup></b>

Between-group comparison of neuropeptide spinal concentrations (mean ± standard deviation) was conducted using a non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance with post-hoc analysis, when required, using the unpaired exact Wilcoxon test following. Tukey adjustment was used to obtain adjusted  $P$ -values for multiple comparisons. Different letters indicate statistically significant difference highlighted by bold font. Surgical models, CCLT: cranial cruciate ligament transection; DMM: destabilization of the medial meniscus; COMBO: combination of both CCLT and DMM; chemical model, MIA: monosodium iodoacetate.

## 2.6.6 Discussion

In the search for an animal model of osteoarthritic pain that would allow the best therapeutic evaluation and translation to other species, this study allowed some preliminary interesting comparisons between the MIA chemical model and different surgical models, particularly the COMBO model. Because the duration of evaluation of the chemical (MIA) and surgical models was different (up to D21 for MIA; up to D42 for surgical models), as well as the time-points distribution, the comparison between the MIA and COMBO models calls for prudence. Nevertheless, the main results are that:

1. Both MIA and COMBO models induced functional alterations in % BW and PWT, these changes lasting for a longer period of time in the COMBO group.
2. Both MIA and COMBO models induced an increased release of pro-nociceptive (CGRP) and anti-nociceptive (SST) neuropeptides.
3. The pain behavioral expression was limited in the surgical CCLT and DMM models, and this was corresponding to an absence of change in spinal neuropeptidomics.

### 2.6.6.1 Functional evaluations

This pilot study highlighted a limited interest in the CCLT and DMM models, as their functional alterations were of short duration, and the change in neuropeptides non-significant, compared to Sham. Interestingly, the functional changes induced by the CCLT and DMM models, were not so different from the Sham group. This suggests that their functional alterations were most likely the result of joint inflammation associated with the arthrotomy, and not the consequence of significant biomechanical instability. It could be argued that the CCLT and DMM models could have shown alterations resulting from biomechanical instability if the rats had been more mobile and active, which was not part of the current study design (Appleton, McErlain et al., 2007). Hence, they could remain interesting models in specific study settings. However, the changes induced by both the MIA injection and COMBO surgery led to biomechanical (SWB), sensory (PWT) and nociceptive neuropeptides changes in the same research context.

The significant weight shift to the left hind paw on SWB in the MIA group could be interpreted as an early occurring but non-persistent biomechanical change since the % BW values for the MIA group were not different from baseline after D7. This phenomenon was not



observed in the surgical groups and could constitute a major difference between the MIA and surgical models. This contralateral weight shift could be indicative of major discomfort in the (affected) RHL with the rat seeking to relieve itself from this acute insult, whereas the more progressive damage in the COMBO model does not produce such intense and early pain. The increase in the left hind PWT contemporary to the decrease of the RHP values could be explained by two hypotheses. First, the significant weight shift to the left hind paw at D3 and D7 in MIA could be responsible for the elevation of the PWT of the left paw of an animal being ‘less responsive’: the animal being very reluctant to bear weight on the painful (right) limb during the inflammatory phase of the MIA model (Fernihough, Gentry et al. 2004; Guingamp, Gegout-Pottier et al., 1997) artificially increases the PWT on the contralateral limb. With regards to the early occurrence of such SWB and PWT shift in the MIA model, it could also reflect early peripheral sensitization, leading subsequently or concomitantly to central sensitization. Second, diffuse descending pain inhibition mechanisms (Eitner, Hofmann et al., 2017; Felson 2005; Le Bars, Dickenson et al., 1979) could be activated very efficiently by the initial strong inflammation present in the MIA-treated stifle and be less intense as time passes and inflammation subsides. It is uncertain at this point if the biomechanical, neurological and/or inflammatory component are responsible for those results. Nonetheless, it constitutes a significant difference between the MIA and the surgical models.

The changes persisted until the last RHP PWT evaluation time-point in the COMBO group and only until D14 for the MIA group. This could be an indication for the capacity of the COMBO model to induce a more persistent tactile allodynia compared to the other models in this study. The group effect in the RHP PWT showed that the COMBO model sensitization was more severe than in the DMM model, because it induced more tactile allodynia. It would be expected that the COMBO model would also be more severe than the CCLT model although the difference was not statistically significant in this study, likely because of a low statistical power (Type-II statistical error). The same explanation applies for the absence of statistical difference between surgical groups for RHL SWB.

#### **2.6.6.2 Biomarkers**

As neuromodulators, SP and CGRP are important mediators in peripheral and central sensitization in inflammatory arthritis and OA (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al.,

2017; Schaible, Richter et al., 2009). Both SP and CGRP were higher in the COMBO model than in the other surgical models, but only CGRP reached statistical significance. CGRP is accepted as an important mediator in subchondral (Aso, Izumi et al., 2016) and central OA pain signalling using the MIA model (Ferland, Laverty et al., 2011a; Otis, Gervais et al., 2016) and a surgical model (Ferland, Laverty et al., 2011a) in rats. This suggests that there was induction of neuronal plasticity at the central level for the COMBO model too.

The significantly lower SST in the Sham and CCLT groups compared to the COMBO group is interesting as it could indicate a greater potential of the COMBO model to induce allodynia. SST has not been evaluated specifically in osteoarthritic conditions. It was mostly studied for inflammatory conditions like rheumatoid arthritis and asthma (Pintér, Helyes et al., 2006). With the hypothesis that the inflammatory component of the disease is likely to be a major contributor to the pathological pain, it would be expected that if a model causes more inflammation, it could induce more allodynia. Additionally, such SST spinal release could be associated with an increased descending nociceptive inhibition (Bär, Schurigt et al., 2004; Pintér, Helyes et al., 2006). This phenomenon of increased inflammation and concomitant inhibitory pain modulation could be monitored by the quantification of SST in a research setting. Finally, BK has been studied in multiple species and reported to be involved in OA pain (Meini and Maggi 2008). However, it was not possible to detect significant change in the current study.

The significantly higher values of CGRP, SST and BK in the MIA model could indicate that it causes more pain and has a greater potential for allodynia induction. But, the comparison with the COMBO group is limited since the time frame for both groups was different as was the time of spinal cord collection. Both the MIA and the surgical models are expected to require time to develop significant articular lesions and neuronal plasticity (Bendele 2001; Orita, Ishikawa et al., 2011). Previous studies in surgical models showed that at least six weeks might be required for structural changes to occur after CCLT and meniscectomy (Hayami, Pickarski et al., 2006), but it was faster for DMM with micro-computed tomography detection (Iijima, Aoyama et al., 2014; Iijima, Aoyama et al., 2016a; Iijima, Aoyama et al., 2016b). The medial meniscal tear (MMT, or meniscotomy) model (Bendele 2001; Bove, Laemont et al., 2006) induced structural alterations and mechanical allodynia similar to the PWT evolution observed with the COMBO in the current study. This was also the case for (partial or total) medial

meniscectomy alone (Fernihough, Gentry et al., 2004; Mapp, Sagar et al., 2013) or combined with CCLT (Ferland, Laverty et al., 2011a; Tsai, Chen et al., 2018) presenting similar evolution than COMBO for gait analysis and mechanical allodynia. In one study (Mapp, Sagar et al., 2013), the surgical model induced more structural and pain functional alterations than the MIA, whereas in another it was the contrary (Ferland, Laverty et al., 2011a), but the MIA dose used was very different, 1 (Mapp, Sagar et al., 2013) *versus* 3 mg (Ferland, Laverty et al., 2011a), as potential explanation for apparent divergence. The maximal potential for pathological pain induction of the COMBO model might not have been reached at D42 (Bendele 2001; Ferland, Laverty et al., 2011a). Because of the pilot setting of the study, the 3Rs' rules ([www.nc3rs.org.uk/the-3rs](http://www.nc3rs.org.uk/the-3rs)) and the objective to compare these different preclinical OA models, a limited number of rats was used to determine potential better model.

In a context of hypothesis generation, this pilot study was conducted to detect the influence of the three surgical models on pain outcomes in comparison to the IA MIA model as gold standard of OA pain model in rats:

- Because the focus of the research was about pain management, we restricted the evaluation to pain functional and neuropeptidomics outcomes. The idea was first to compare the validity of each model on pain outcomes to further pursuing the development of the most valid pain model.
- The subsequent development of the most valid model would include structural changes, longer evaluation, as well as influence of gender or hormonal effect, exercise, age and strains of tested rats in the structural and pain functional & neuropeptidomics outcomes (van der Kraan 2017).
- By processing like this, we would favour the 3Rs' rules and avoid to multiply use of research animals in terminal procedures.

The use of DMM was previously studied in mice (Glasson, Blanchet et al., 2007; Inglis, McNamee et al., 2008) and rat (Iijima, Aoyama et al., 2014; Iijima, Aoyama et al., 2016a; Iijima, Aoyama et al., 2016b) for structural and biomarker assessment. To our knowledge, it is the first application of this surgical model in rats for pain assessment. It was selected because of the ease of induction and standardization compared to the meniscectomy, as well as the validity in induced structural alterations. Consequently, the COMBO model appears as a new surgical OA model in rats.

The rat species was selected for its ease of behavioral assessment and popularity in OA pain investigation, even if other species are presenting advantages (genetically modified animals for studying specific pathophysiological pathways in mice, anatomic and biomechanical translational value for large animals, etc.) (Malfait and Schnitzer 2013). In particular, the common use of MIA OA pain model in rats has led to behavioral and neuropeptidomic characterization by our group (Otis, Gervais et al., 2016; Otis, Guillot et al., 2017) and others (for review, see Malfait and Schnitzer 2013).

Therefore, this study suggests highly to favor the COMBO model for further investigations. Only female rats were used in this pilot, because of the recognized higher occurrence of OA in women (Cross, Smith et al., 2014; Palazzo, Nguyen et al., 2016), and the recognized experimenter's gender effect on responses in behavioral testing (Sorge, Martin et al., 2014). Exposure of mice and rats to male, but not female, experimenters produced pain inhibition, and this effect of stress-induced analgesia is really stronger in female mice (Sorge, Martin et al., 2014). For these reasons, we opted for female rats and only female experimenters completed all functional assessments and animal manipulations. Following this pilot study, it was calculated that, to reach a statistical power of 80 % with an alpha-value of 0.05, 11-12 rats per group would be required to document an 8 % difference in the SWB and 10 g in the PWT. Those numbers reflect the difference documented between the Sham and COMBO groups.

### **2.6.7 Conclusion**

In conclusion, the surgical induction of OA was accompanied by quantifiable neurophysiological changes associated with pain, as shown by functional analysis, spinal neuropeptides and comparison with the current gold standard of OA pain in rats, the MIA model. The research hypothesis was confirmed and objectives reached. The COMBO model can induce changes compatible with chronic pain and comparison with the MIA model indicates more persistent changes potentially useful for the evaluation of therapeutic modalities. Indeed, the limited (in time) alterations in the 2 mg MIA model reduce drastically the accessible window for assessing any therapeutic efficacy. Moreover, the changes observed in the COMBO surgical model seem more progressive and consequently present higher degree of face validity with natural post-traumatic OA. Prospective studies with a larger number of animals, different durations of follow-up, multiple time points evaluation of the structural, functional, epigenomic

and neuroproteomic changes, as well as possible influence of gender, age and strains of rats would help to obtain a better characterization of the COMBO model. Validation with therapeutic intervention should also be performed.

### **2.6.8 Acknowledgements**

The authors would like to thank ArthroLab Inc. personnel for their support to this work.

### **2.6.9 Declaration of conflicting interests**

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### **2.6.10 Funding**

This work was supported (Pr. Eric Troncy) in part by a Pfizer Neuropathic Pain research award (#WS386180) from Pfizer Canada, Inc., by a Discovery grant (#327158–2008, #441651–2013, #386637-2010 (Dr. Francis Beaudry) supporting salaries) and Collaborative Research and Development grants (#RDCPJ 418399–2011, #RDCPJ 491953-2016 supporting operations and salaries in partnership with ArthroLab Inc.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, as well as by an ongoing New Opportunities Fund grant (#9483) and a Leader Opportunity Fund grant (#24601), supporting pain/function equipment, from the Canada Foundation for Innovation.

### **2.6.11 References**

- Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, et al. (2007) Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9: R13.
- Aso K, Izumi M, Sugimura N, et al. (2016) Nociceptive phenotype alterations of dorsal root ganglia neurons innervating the subchondral bone in osteoarthritic rat knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*.
- Bär KJ, Schurigt U, Scholze A, et al. (2004) The expression and localization of somatostatin receptors in dorsal root ganglion neurons of normal and monoarthritic rats. *Neuroscience* 127: 197-206.

- Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, et al. (2007) Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 1190-8.
- Bendele AM (2001) Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*: 363-76.
- Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, et al. (2006) Surgically induced osteoarthritis in the rats results in the development of osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1041-1048.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, et al. (2006) Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life and treatment. *Eur J Pain* 10: 287-333.
- Cross M, Smith E, Hoy D, et al. (2014) The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimated from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 73, 1323-1330.
- Curran-Everett D and Benos DJ (2004) Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am J Physiol* 287: L259-61.
- Eitner A, Hofmann GO and Schaible HG. (2017) Mechanisms of osteoarthritic pain. Studies in humans and experimental models. *Front Mol Neurosci* 10:349.
- Felson DT (2005) The sources of pain in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17: 624-28.
- Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, et al. (2011a) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 603-10.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, et al. (2011b) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45: 423-429.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. (2004) Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112: 83-93.
- Glasson SS, Blanchet TJ and Morris EA (2007) The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis and Cartilage* 15: 1061-69.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, et al. (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 40: 1670-9.

- Guzman RE, Evans MG, Bove S, et al. (2003) Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31: 619-24.
- Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, et al. (2006) Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38: 234-43.
- Hummel M and Whiteside GT. (2017) Measuring and realizing the translational significance of preclinical *in vivo* studies of painful osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 25: 376-384.
- Iijima H, Aoyama T, Ito A, et al. (2014) Destabilization of the medial meniscus leads to subchondral bone defects and site-specific cartilage degeneration in an experimental rat model. *Osteoarthritis Cartilage* 22: 1036-1043.
- Iijima H, Aoyama T, Tajino J, et al. (2016a) Subchondral plate porosity colocalizes with the point of mechanical load during ambulation in a rat knee model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 354-363.
- Iijima H, Aoyama T, Ito A, et al. (2016b) Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 1092-1102.
- Im HJ, Kim JS, Li X, et al. (2010) Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis & Rheumatology* 62: 2995-3005.
- Inglis JJ, McNamee KE, Chia SL, et al. (2008) Regulation of pain sensitivity in experimental osteoarthritis by the endogenous peripheral opioid system. *Arthritis Rheum* 58: 3110-19.
- Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, et al. (2003) Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci* 65: 1195-9.
- Le Bars D, Dickenson AH and Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6: 283-304.
- Little CB and Smith MM (2008) Animal models of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rev* 4: 1-8.
- Little CB and Zaki S (2012) What constitutes an "animal model of osteoarthritis" - the need for consensus? *Osteoarthritis Cartilage* 20: 261-67.
- Malfait AM and Schnitzer TJ (2013) Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 9: 654-64.



- Mapp PI, Sagar DR, Ashraf S, et al. (2013) Differences in structural and pain phenotypes in the sodium monoiodoacetate and meniscal transection models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1336-1345.
- Meini S and Maggi CA (2008) Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflamm Res* 57: 351-61.
- Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, et al. (2011) Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 134.
- Otis C, Gervais J, Guillot M, et al. (2016) Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. *Arthritis Res Ther* 18: 150.
- Otis C, Guillot M, Moreau M, et al. (2017) Spinal neuropeptide modulation and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Neuropeptides* 65: 56-62.
- Palazzo C, Nguyen C, Lefevre-Colau MM, et al. (2016). Risk factors and burden of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med* 59: 134-138.
- Pintér E, Helyes Z and Szolcsányi J (2006) Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* 112: 440-56.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114: 339-46.
- Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, et al. (2009) Joint pain. *Exp Brain Res* 196: 153-62.
- Shearer P (2011) Epidemiology of orthopedic disease. *Vet Focus* 21: 24-25.
- Slingerland LI, Hazewinkel HA, Meij BP, et al. (2011) Cross-sectional study of the prevalence and clinical features of osteoarthritis in 100 cats. *Vet J* 187: 304-309.
- Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, et al. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11: 629-32.
- Tsai HC, Chen TL, Chen YP, et al. (2018) Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. *J Pain Res* 11: 41-50.
- Udo M, Muneta T, Tsuji K, et al. (2016) Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 1284-1291.



- van der Kraan PM. (2017) Factors that influence outcome in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 25: 369-375.
- Vermeirsch H, Biermans R, Salmon PL, et al. (2007) Evaluation of pain behavior and bone destruction in two arthritic models in guinea pig and rat. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 349-359.
- Williams J, Felten D, Peterson R, et al. (1982) Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* 134: 103-09.
- Zhang RX, Ren K and Dubner R (2013) Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1308-15.

## **2.7 Compléments d'analyses de la quantification de la TTR spinale dans le modèle murin**

### **2.7.1 Avant-propos**

Puisque les deux premières études (Publications des sections 2.1 et 2.2) ont permis d'identifier et de démontrer que la TTR est un possible marqueur potentiel de douleur et du bien-être animal dans le modèle bovin de douleur viscérale et le modèle canin de douleur chronique arthrosique, il devenait donc pertinent pour la suite des travaux, de vérifier, au niveau du SNC, son expression et sa modulation dans des homogénats de moelle épinière dans les modèles rongeurs de douleur chronique centralisée liée à l'arthrose.

Suite aux expérimentations des publications des sections 2.3, 2.4, 2.5 et 2.6, la TTR a été mesurée, dans la moitié des échantillons seulement, de façon exploratoire dans l'homogénat de moelle épinières de ces modèles rongeurs de douleur chronique liée à l'arthrose. Pour les détails exacts de chacun des groupes expérimentaux, bien vouloir se référer respectivement à la section des matériels et méthodes de chacun des articles mentionnés au début de ce paragraphe. L'ensemble des expérimentations concernant les compléments d'analyses de la TTR spinale dans le modèle murin ont été réalisés par Mme Colombe Otis.

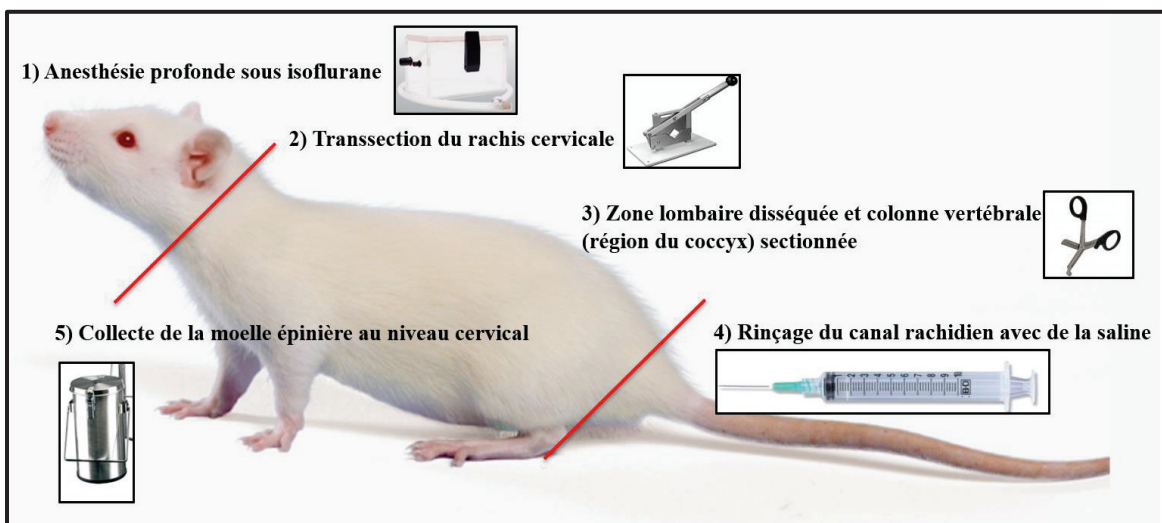
Les résultats de ces analyses exploratoires de la quantification de la TTR sont montrés dans cette section puisqu'ils n'ont pas été inclus dans les articles pour publication. En effet, puisque la quantification n'a pas été réalisée dans l'ensemble des moelles épinières des rats et donc avec un nombre très peu élevé d'échantillon pour chacun des groupes, induisant donc un manque de puissance statistique pour les analyses. De plus, lorsque nous avons voulu compléter les dosages manquants, les ensembles d'immunodosages n'étaient plus disponibles commercialement par la compagnie et un équivalent n'a pas été trouvé quant à la spécificité de l'espèce animale et l'éventail des concentrations de la courbe standard, donc nous avons été contraints à ne pas inclure ces résultats individuellement dans les articles.

Par contre, il n'en reste pas moins que le regroupement de ces résultats comme ils sont présentés dans cette section sont intéressants et ils pourraient éventuellement faire partie d'une publication pilote ou d'une communication brève.

## 2.7.2 Matériels et méthodes

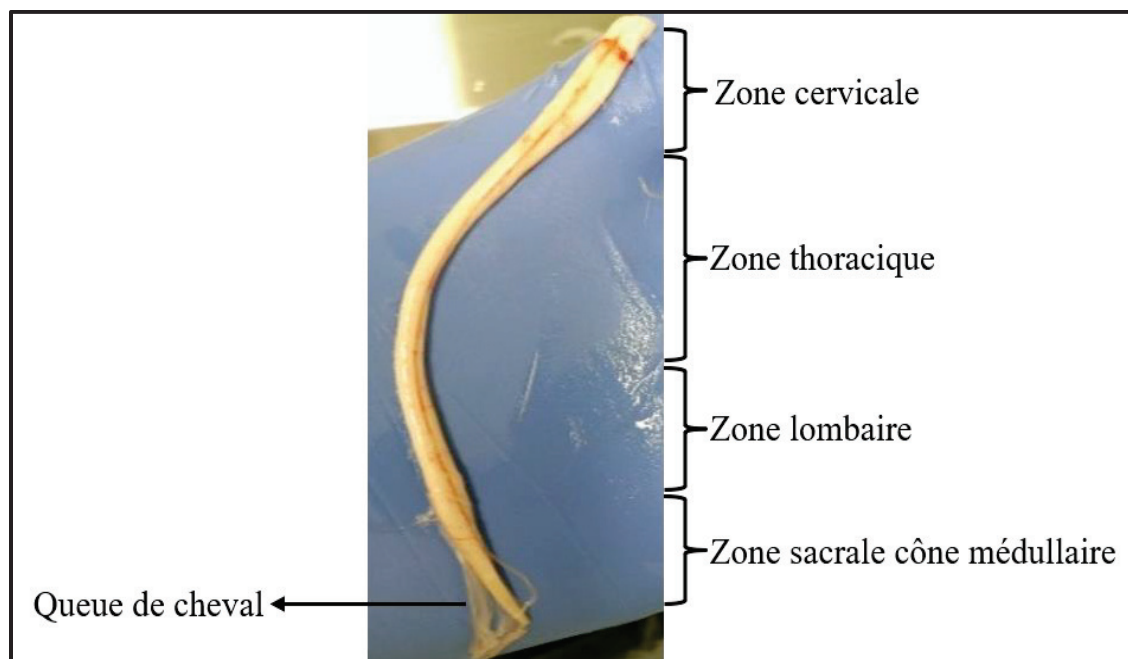
### 2.7.2.1 Collecte des moelles épinières

À la fin chaque période d'expérimentation, lors des sacrifices, la moelle épinière entière des rats est collectée par une méthode qui a été préalablement testée et publiée (Ferland, Laverty et al., 2011a; Ferland, Pailleux et al., 2011b; Beaudry, Ferland et al., 2009). Brièvement, la méthode inclus 5 étapes simples et rapides (**Figure 38**). Suite à une anesthésie profonde des rats sous isoflurane (1), cette méthode consiste à sacrifier les rats par une transection du rachis cervicale à l'aide d'une guillotine (2). Par la suite, la zone lombaire est disséquée puis la colonne vertébrale (région du coccyx) sectionnée à l'aide de ciseaux de bandage (3). Une seringue de 20 CC, montée avec une aiguille de 21G, est remplie de saline 0.9 % puis insérée dans le canal rachidien au niveau lombaire (4). Un rinçage rapide de la saline contenue dans la seringue est ensuite effectué, permettant ainsi de libérer la moelle épinière (**Figure 39**), sans détérioration du tissu, par le mouvement et la pression du liquide dans le canal rachidien pour finalement être en mesure de pouvoir récolter le tissu au niveau cervical (5).



**Figure 38. Schématisation des étapes pour la collecte de la moelle épinière entière chez le rat de laboratoire.**

À l'aide de pince, la moelle épinière est rapidement plongée dans l'azote liquide afin d'être congelée instantanément pour ensuite être transférée et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de la poursuite des analyses neuroprotéomiques.



**Figure 39. Photo d'une moelle épinière de rat suite à sa collecte par la méthode de rinçage avec la saline dans le canal rachidien.**

### 2.7.2.2 Protocole d'homogénéisation des moelles épinières

Chaque moelle épinière est pesée avec précision et rincée avec une solution tamponnée de PBS 0.01 M pH 7.4, contenant un mélange d'inhibiteur de protéases (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, ON, Canada, no. Catalogue PP8340) à un ratio de 1:5 (volume/volume), afin d'enlever les excédents de sang. Suite au rinçage, la moelle épinière est transférée dans un tube Falcon® de 20 mL auquel est ajoutée selon un ratio de 1:5 (poids/volume), une solution tamponnée de PBS 0.01 M pH 7.4 contenant un mélange d'inhibiteur de protéases (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, ON, Canada, no. Catalogue PP8340) à un ratio de 1:5 (volume / volume) pour finalement être homogénéisée avec un broyeur de tissu mou. Entre chaque échantillon, l'homogénéisateur est rincé dans 3 bains afin d'éviter les contaminations entre les échantillons, dont le contenu est changé entre chaque tissu, selon cette séquence : (i) bain de PBS 0.01 M pH 7.4; (ii) bain H<sub>2</sub>O bidistillée; (iii) bain de méthanol. Ensuite, une partie de l'homogénat obtenu (4 X 500 uL), l'autre portion étant séparé et congelé à -80 °C, est déposé avec des embouts de pipettes coupés sur des filtres YM-50 (Amicon® Ultra 0.5 mL, Ultracel 50K, Millipore Ltd, ON, Canada, no. Catalogue UFC505096), centrifugé 20 minutes à 9000 × g. Les ultrafiltrats ainsi obtenus sont combinés ensemble dans un même tube, mélangés de façon homogène à l'aide

d'un vortex puis séparés (tube avec capuchon vissé) pour finalement être congelés à -80°C jusqu'au moment de la poursuite des analyses neuroprotéomiques.

### 2.7.2.3 Quantification de la TTR par immunodosage

La TTR est quantifiée par une méthode standard d'immunodosage (Rat prealbumin ELISA kit, Immunology Consultants Laboratory Inc., Newberg, OR, no. Catalogue E-25PRE) selon le protocole fourni par la compagnie. Brièvement, 100 uL de volume d'ultrafiltrat, sans aucune dilution, en duplicata, est utilisé pour la quantification de la TTR pour les échantillons des moelles épinières de rat. La densité optique est lue à 450 nanomètre avec une correction à 540 nanomètre selon les recommandations du manufacturier. Les résultats finaux sont calculés en intégrant les valeurs brutes à la courbe standard s'échelonnant de 0 à 500 ng/mL.

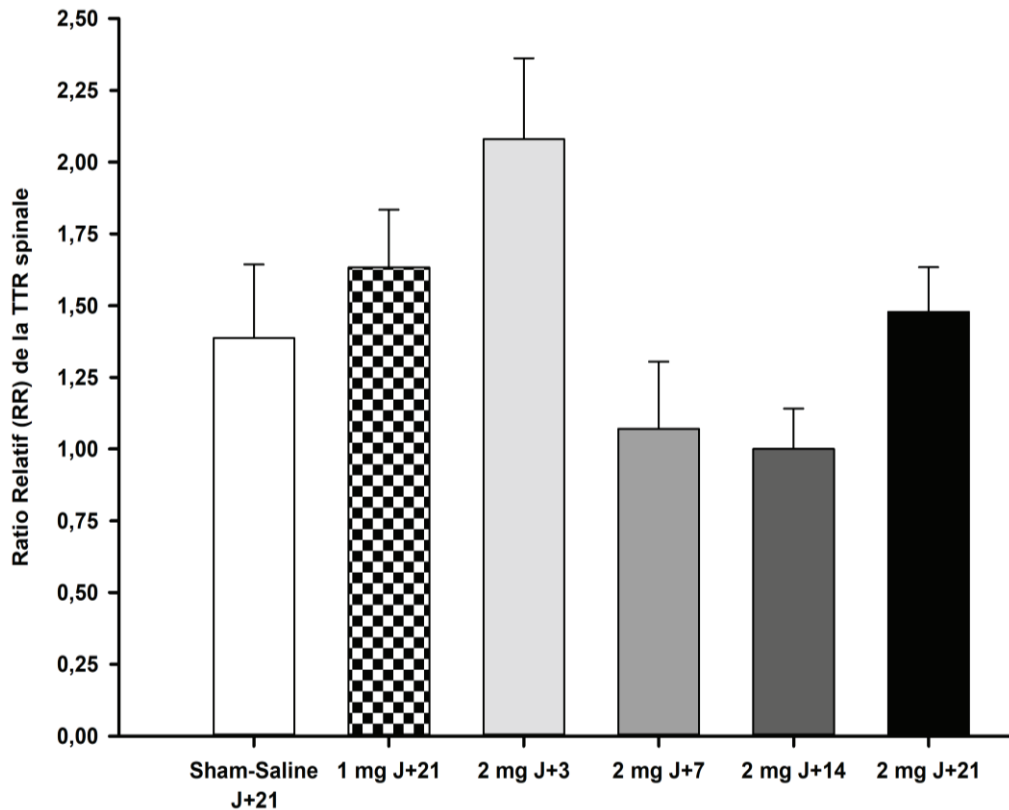
### 2.7.3 Résultats

La TTR a été mesurée de façon exploratoire dans l'homogénat de moelle épinière des modèles rongeurs par immunodosage. Les résultats des valeurs brutes des concentrations spinales de la TTR ainsi que le ratio relatif (normalisé selon le nadir) sont présentés ci-bas (**Tableau XX**). La **Figure 40** illustre les ratios relatifs de l'évolution temporelle des concentrations de la TTR spinale pour les groupes du modèle chimique par le MIA d'induction de l'arthrose, le modèle MIA 2 mg étant plus douloureux que le modèle MIA 1 mg. La **Figure 41** quant à elle montre ceux des concentrations de la TTR spinale à J+21 pour les groupes MIA 2 mg avec traitements pharmacologiques permettant aux traitements curatifs de ramener la TTR à des niveaux similaires. La régulation de la TTR spinale à J+56 pour les groupes chirurgicaux est montrée dans la **Figure 42** avec une modulation de ce biomarqueur équivalent pour le modèle de la combinaison CCLT-DMM et DMM seule, mais induisant plus de douleur pour ces deux modèles en comparaison avec le modèle CCLT.

**Tableau XX. Concentrations de la TTR spinale dans les modèles rongeurs.**

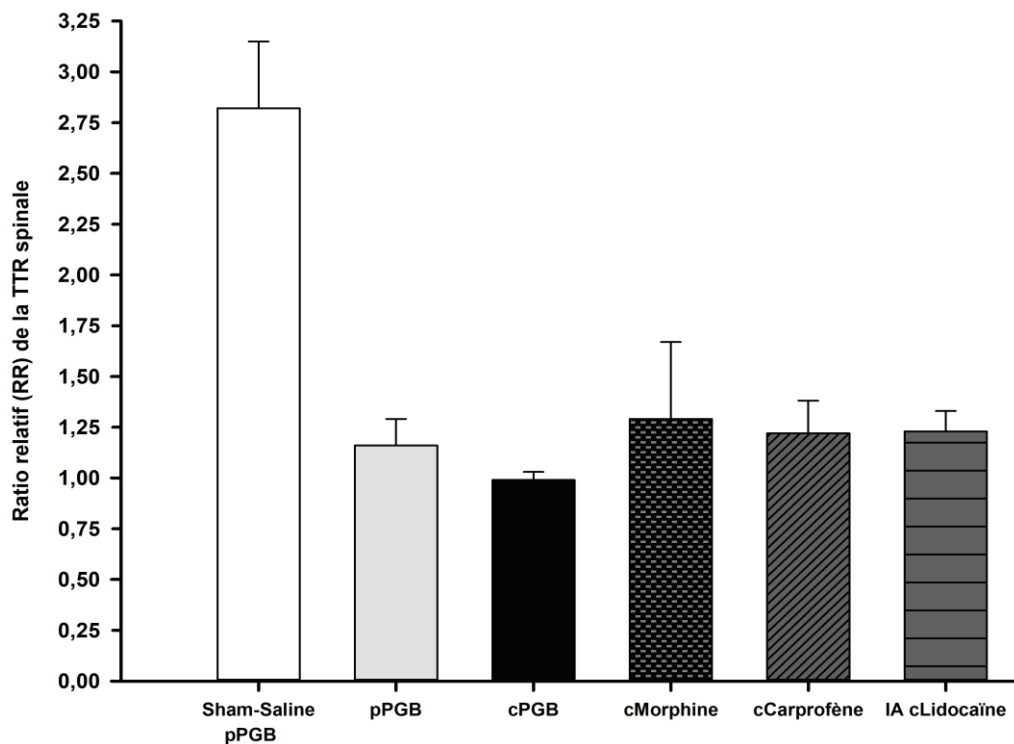
Groupes expérimentaux	Nombre (n)	Concentration (ng/ml) ± SE	Ratio relatif* (RR) ± SE
<b>MIA</b>			
Sham-Saline J+21	4	21,66 ± 4,02	1,40 ± 0,26
1 mg J+21	3	25,50 ± 3,14	1,63 ± 0,20
2 mg J+3	4	32,49 ± 4,40	2,08 ± 0,56
2 mg J+7	3	16,71 ± 3,68	1,07 ± 0,23
<b>2 mg J+14</b>	<b>4</b>	<b>15,62 ± 2,20</b>	<b>1,00 ± 0,14</b>
2 mg J+21	3	23,08 ± 2,44	1,48 ± 0,16
<b>MIA 2 mg + Traitements</b>			
Sham-Saline J+21 - pPGB	4	44,09 ± 5,11	2,82 ± 0,33
2 mg J+21 - pPGB	7	18,09 ± 1,96	1,16 ± 0,13
2 mg J+21 - cPGB	4	15,41 ± 0,68	0,99 ± 0,04
2 mg J+21 - cMorphine	4	20,10 ± 5,96	1,29 ± 0,38
2 mg J+21 - cCarprofène	4	18,98 ± 2,43	1,22 ± 0,16
2 mg J+21 – IA cLidocaïne à J+7, J+14, J+21	3	19,64 ± 1,62	1,23 ± 0,10
<b>Chirurgicaux</b>			
Sham-Chirurgie J+56	6	09,95 ± 1,09	0,64 ± 0,07
CCLT J+56	6	10,42 ± 0,87	0,67 ± 0,06
DMM J+56	6	08,10 ± 0,90	0,52 ± 0,06
CCLT + DMM J+56	6	08,42 ± 1,14	0,48 ± 0,11

\*Normalisation en fonction du nadir, soit le groupe MIA 2 mg J+14. Monosodium iodoacetate (MIA), ratio relatif (RR), jour (J), prégabaline préventive (pPGB), prégabaline curative (cPGB), morphine curative (cMorphine), carprofène curative (cCarprofène), lidocaïne curative (cLidocaïne), transection du ligament croisé crânial (CCLT), déstabilisation du ménisque médial (DMM), intra-articulaire (IA).



**Figure 40. Ratio relatif (moyenne  $\pm$  SE) de l'évolution temporelle des concentrations de la TTR spinale pour les groupes MIA.**

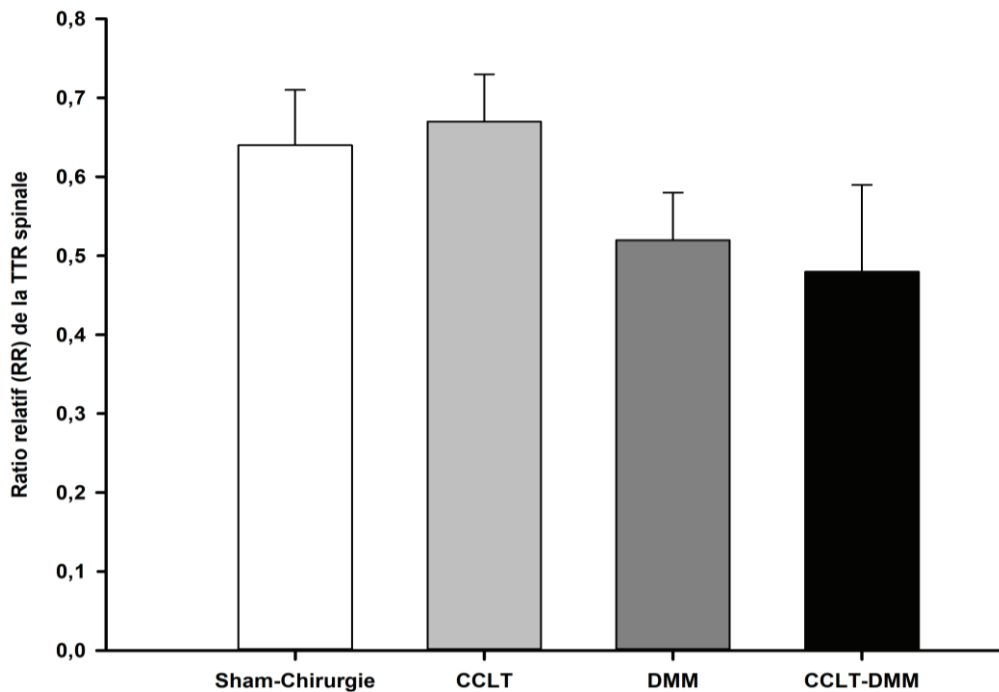
Normalisation en fonction du nadir, soit le groupe MIA 2 mg J+14. En fonction du postulat que plus la concentration de TTR est diminuée, plus la douleur est importante, on peut noter l'évolution temporelle de la douleur (en fonction des concentrations normalisées de la TTR), et aussi noter qu'à J+21, le modèle MIA 2 mg est plus douloureux que MIA 1 mg, lui-même plus douloureux que Sham-Saline. Monosodium iodoacetate (MIA), ratio relatif (RR), jour (J), transthyréine (TTR).



**Figure 41. Ratio relatif (moyenne  $\pm$  SE) des concentrations de la TTR spinale à J+21 pour les groupes MIA 2 mg avec traitements pharmacologiques.**

Normalisation en fonction du nadir, soit le groupe MIA 2 mg J+14. Si la concentration de la TTR reflète une relation inverse avec le niveau de douleur, lors on constate que le Sham-Saline – pPGB n'a pas rencontré aucune baisse des concentrations de TTR, et que tous les autres traitements curatifs (cMorphine, cCarprofène et IA cLidocaïne) ont ramené la concentration de TTR à des niveaux semblables. Monosodium iodoacetate (MIA), ratio relatif (RR), intra-actriculaire (IA), jour (J), transthyrétine (TTR), curatif (c), préventif (p), prégabaline (PGB).





**Figure 42. Ratio relatif (moyenne  $\pm$  SE) des concentrations de la TTR spinale à J+56 pour les groupes chirurgicaux.**

Normalisation en fonction du nadir, soit le groupe MIA 2 mg J+14. Si la concentration de la TTR reflète une relation inverse avec le niveau de douleur, alors le modèle CCLT-DMM est équivalent au DMM, et induit plus de douleur que le CCLT qui est lui-même équivalent au Sham-Chirurgie. Ratio relatif (RR), jour (J), transthyréine (TTR), transection du ligament croisé crânial (CCLT), déstabilisation du ménisque médial (DMM).

## 2.7.4 Discussion

Les résultats préliminaires vont dans le même sens que les observations obtenues dans le modèle bovin et canin. En effet, la TTR est régulée à la baisse par un niveau de douleur élevée. Lorsque les concentrations spinales sont normalisées en fonction du groupe ayant le plus faible taux de TTR, mais le plus haut degré de douleur, c'est-à-dire le groupe MIA 2 mg 14 jours après son induction (le nadir), on remarque que les divers traitements pharmacologiques analgésiques augmentent les taux de TTR reflétant également une relation inverse de la TTR avec le niveau de douleur tout comme observée dans les modèles bovin et canin. De façon temporelle, on note que les concentrations de TTR diminuent à partir de 7 jours après l'induction de douleur avec le MIA pour se maintenir jusqu'à jour 14 et ensuite, à jour 21, les concentrations reviennent à ceux de 3 jours (**Figure 40**).

Les traitements pharmacologiques permettent de réguler la TTR à la hausse donc moins de douleur dans ces groupes notamment davantage pour ceux recevant la cMorphine, mais aucun effet pour la cPGB curative sur les taux de TTR (**Figure 41**). Le modèle chirurgical a induit plus de douleur avec des taux de TTR plus faibles que le modèle MIA (**Figure 42**).

Par contre, ces résultats sont exploratoires et un manque de disponibilité du matériel d'immunodosage et l'hypothèse d'un manque de spécificité (résultats des groupes naïfs aberrants) ne nous a pas permis de compléter les analyses. Il n'en reste pas moins que la TTR semble également être modulée selon le niveau de douleur dans les modèles rongeurs donc supportant l'hypothèse que la TTR peut être un biomarqueur potentiel de la douleur comme il a été observé dans les modèles des publications 2.1 et 2.2., mais des analyses supplémentaires sont requises. Pour la discussion spécifique concernant l'implication et les liens possibles de la TTR avec la douleur, bien vouloir se référer à la Discussion de ce manuscrit, soit plus spécifiquement la section 3.1.3.

### **2.7.5 Références**

- Beaudry F, Ferland CE and Vachon P (2009) Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 23: 940-50.
- Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, et al. (2011a) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 603-10.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, et al. (2011b) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45: 423-429.

### **3. Discussion**

Les travaux de recherche de cette thèse confortent l'hypothèse i) que l'hypersensibilisation peut être détectée, élucidée et quantifiée, particulièrement au niveau du protéome spinal dans des modèles animaux de douleur chronique. L'ensemble des résultats supporte positivement également la seconde hypothèse ii) qu'une gestion adéquate de la douleur atténue cette hypersensibilisation et ses conséquences morbides. Ces 2 hypothèses ont été validées dans différents modèles expérimentaux de douleur chronique selon une approche translationnelle. Par ailleurs, les objectifs ont été atteints : (i) les atteintes du protéome spinal en fonction du niveau de douleur perçue par l'animal à l'aide d'outils d'évaluation fonctionnelle et neuroprotéomique de la douleur ont été caractérisées; (ii) l'identification de marqueurs comme la TTR, la SP, le CGRP, la BK puis la SST, modulés par l'hypersensibilisation nociceptive ont été identifiés dans des modèles expérimentaux de douleur bovine, canine et murine.

La discussion détaillée sera abordée ici selon deux volets; le premier traitant de l'utilisation de la neuroprotéomique (phase de développement et d'identification neuropeptidomique (Publications 2.1 et 2.2 et section 2.7)) à des fins de découverte de nouveaux biomarqueurs potentiels de la douleur tandis que le deuxième volet traitera de la validation (phase de validation (Publication 2.3 à 2.6 et section 2.7)) de l'utilisation de la neuroprotéomique afin d'évaluer l'impact de la douleur chronique dans le protéome spinal en partenariat avec le développement d'outils d'évaluation fonctionnelle de la douleur.

#### **3.1 Phase de développement et d'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels de la douleur chronique par neuroprotéomique**

##### **3.1.1 Résumé des résultats de recherche**

Tout d'abord, les marqueurs neuroprotéomiques de la douleur ont été étudiés dans un modèle de douleur viscérale chez la vache laitière (Publication 2.1) de façon exploratoire. L'objectif principal de cette étude pilote, prospective, en aveugle, randomisée et contrôlée était de développer et valider des méthodes d'évaluation subjective et objective de la douleur

permettant la distinction entre trois niveaux d'analgésie différents (faible, modérée et élevée) sur une période de 21 jours. Les méthodes d'évaluation comportementale et physiologique ont été validées en termes de spécificité, sensibilité et reproductibilité. Le critère du comportement alimentaire, les échelles de score de la douleur, l'activité électrodermique ainsi que la concentration plasmatique en cortisol sont des paramètres qui ont été en mesure de distinguer de façon statistiquement significative les trois niveaux d'intensités de douleur. De plus, les vaches douloureuses (niveau d'analgésie faible) de cette étude ont développé de l'hypersensibilité suite à des stimulations d'algomètre mécanique tout en diminuant leur activité motrice et en exprimant des signes d'agitation mesurés par l'activité motrice et la vidéo-analyse.

Cette étude a permis dans un premier temps d'identifier un nouveau marqueur neuroprotéomique potentiel de la douleur. Suite à une séparation protéique selon le poids moléculaire du LCR par SDS-PAGE, une différence dans la densité pour une bande se situant autour de 15 KDa a été observée. L'intensité de cette bande était statistiquement moindre dans les échantillons de LCR post-opératoire de 21 jours comparativement à celle du LCR prélevé 7 jours avant la chirurgie. Suite à l'excision puis à la digestion tryptique de cette bande, nous avons identifié par HPLC-MS/MS sur un « *high-throughput screening* » sur la base de 120 protéines, que cette bande contenait une protéine de 15 717 daltons nommée TTR de *Bos taurus* (code protéine : gi | 27806789) formée de 147 a.a. avec un recouvrement de séquence de 70 %. Or, ce modèle de douleur viscérale nous a permis de démontrer que plus les niveaux de TTR diminuaient, plus la douleur était intense, d'où la possibilité d'entrevoir la TTR comme un biomarqueur de la douleur.

Les résultats de cette étude supportent le développement de sensibilisation centrale dans ce modèle de douleur viscérale chez la vache pouvant être mesurée par une sous-régulation de la TTR au niveau spinal corrélée de façon inverse avec le niveau de douleur perçu par l'animal parallèlement au développement de sensibilisation mécanique, à une diminution de l'activité motrice, une augmentation d'agitation et une diminution de la NA cérébrospinale à long terme.

La quantification du biomarqueur de la TTR identifiée dans le modèle de douleur viscérale bovine a par la suite été validée sur un modèle de douleur arthrosique canine (Publication 2.2) suite à une induction chirurgicale. L'objectif de cette seconde étude randomisée, en double aveugle et contrôlée était d'établir une association entre la douleur centrale et les symptômes de l'arthrose canine à l'aide d'un médicament non-analgésique. Sur

ce modèle expérimental de douleur chronique arthrosique, les chiens traités avec un structuromodulateur (le biphosphonate qui est un agent anti-ostéoclastique visant la résorption osseuse) ont démontré moins de signes de douleur en comparaison au groupe recevant le traitement placebo. Ces différences dans les niveaux de douleur ont été détectées et quantifiées et plusieurs outils d'évaluation de types comportementale (analyse cinétique de la démarche, vidéo analyse et grille de douleur), neurophysiologiques (tests sensoriels quantitatifs), physiologiques (activité motrice et activité électrodermique) et neuroprotéomiques (neuropeptides spinaux) de la douleur chronique ont été validés (spécificité et fiabilité) quant à leur association ou non avec le développement du phénomène de la sensibilisation douloureuse. Des concentrations plus faibles de SP contrairement à des taux plus élevés de TTR dans l'homogénat de moelle épinière ont été notées chez les chiens arthrosiques recevant le biphosphonate. En plus de valider la présence et la modulation des taux de la TTR au niveau spinal, cette étude a permis aussi de lier la diminution de la TTR spinale avec une augmentation concomitante de la SP pour des chiens arthrosiques recevant le placebo en association avec le développement de sensibilisation périphérique et centrale (mesurée par des QSTs du genou et de la queue respectivement). Cette sensibilisation centrale était aussi associée avec les paramètres comportementaux du PVF (diminution), de la marche avec plein appui de la patte opérée (augmentation) puis également liée aux données physiologiques de l'activité motrice (augmentation) et de l'activité électrodermique (augmentation). Les résultats de cette étude suggèrent que la mesure de la sensibilisation centrale permet de mieux comprendre les liens entre la douleur et les mesures comportementales, physiologiques et neuroprotéomiques utilisées pour quantifier la douleur. Cette étude a également permis de mettre en évidence la pertinence de l'utilisation des tests sensoriels quantitatifs comme un prédicteur des symptômes douloureux de l'arthrose canine liée à la sensibilisation centrale et conséquemment, de la détection des effets analgésiques inattendus du biphosphonate.

### **3.1.2 La neuroprotéomique est un outil de mesure fiable et valide de la douleur chronique : Identification de la TTR comme biomarqueur de la douleur**

La quantification des neuropeptides a permis d'augmenter la validité des autres méthodes de mesures de la douleur dans ces deux études (Publications 2.1 et 2.2) afin de mesurer le niveau de développement de la sensibilisation centrale lié à ces modèles expérimentaux de douleur animale. La neuroprotéomique a été la mesure la plus spécifique et sensible afin de discriminer entre les différents niveaux de douleur chronique perçue par ces animaux en plus de permettre la détection des effets bénéfiques analgésiques des agents pharmacologiques testés. La modulation de ces neuropeptides était concomitante avec le degré de développement de la sensibilisation centrale.

Les résultats de ces deux études quant à l'utilisation de la neuroprotéomique pour la mesure de la douleur ont permis de mettre en évidence par spectrométrie de masse un nouveau biomarqueur potentiel de la douleur *via* l'identification de la TTR. La quantification de la TTR au niveau spinal, que ce soit dans le LCR ou dans l'homogénat de la moelle épinière, n'est pas un marqueur commun ou bien une mesure usuelle de la douleur. L'identification et la modulation (diminution spinale significative en présence de douleur) de sa présence ont été identifiées au niveau spinal dans le modèle de douleur viscérale de la vache (étude exploratoire), validées dans le modèle canin de douleur arthrosique (étude de validation) puis des analyses complémentaires dans les études chez les rongeurs ont démontré la même tendance (section 2.7). Ces résultats suggèrent que la quantification des concentrations de la TTR dans des tissus ou fluides biologiques du SNC est un biomarqueur lié à une douleur centralisée.

C'est cette découverte qui nous a amenés à révéler l'intérêt scientifique d'une telle molécule pour l'étude de la douleur et vérifier par la suite l'implication hypothétique dans la littérature de la TTR dans les mécanismes sous-jacents de la douleur.

La mise en évidence de nouveaux marqueurs protéiques de la douleur chronique est pertinente puisque le fait de cibler les récepteurs peptidiques semble offrir de nouvelles stratégies thérapeutiques intéressantes dans le soulagement de la douleur chronique (Malfait et al., 2013). En effet, la sous-régulation de la TTR dans nos travaux en présence de douleur supporte l'usage de la neuroprotéomique comme une méthode fiable et sensible pour étudier les

changements neurophysiologiques au niveau du SNC lors de douleur chronique. L'étude de l'expression de l'ensemble des protéines dans un compartiment biologique spécifique à un moment précis ou dans des conditions données permet de mieux comprendre les pathologies ou ses symptômes et conséquemment, l'implication des cascades d'évènements menant au phénomène de la douleur en neurosciences, telle que la neuroprotéomique. En effet, l'identification par neuroprotéomique de la protéine [des-Ser1]-cerebelline comme un neuropeptide induisant de l'hypersensibilité mécanique (Su et al., 2014) dans la corne dorsale de la moelle épinière de souris saine a été réalisée par spectrométrie de masse avant sa colocalisation par immunohistochimie avec la calbindine, un marqueur d'interneurones excitateurs (Freund et al., 1991). La mise en évidence par la spectrométrie de masse de la quantification des métabolites actifs de la SP (Saidi et al., 2016) et des tachykinines (Pailleux et al., 2013) de même que les enzymes de maturations de la DYN (Orduna et al., 2016) dans la moelle épinière sont d'autres exemples appuyant la pertinence de l'utilisation de la protéomique dans sa participation au raffinement de la compréhension des mécanismes douloureux et des cibles pharmacologiques potentielles.

Il a été démontré dans différents modèles expérimentaux de douleur chronique, notamment dans un modèle rongeur de douleur neuropathique, que les concentrations de la TTR de la moelle épinière sont diminuées de trois fois comparativement à celles des rats sham (Afjehi-Sadat et al., 2010). Dans le LCR de femmes atteintes de douleur chronique généralisée telle que la fibromyalgie, une diminution importante de la régulation de la TTR est notée dans le protéome spinal comparativement à des femmes en santé (Olausson et al., 2017). Ce même profil de diminution en TTR sanguin a été observé chez l'humain quelques heures après une intervention chirurgicale (Fricova et al., 2010).

Malgré que la quantification dans le LCR soit une méthode invasive et non facilement accessible en clinique, pour ces deux études, nous avons misé sur la mesure de la TTR dans des compartiments du SNC suite à notre découverte et celle-ci s'intégrait et respectait notre ligne directrice de l'une de nos problématiques du départ, soit la faisabilité de quantifier objectivement la sensibilisation centrale. L'utilisation du LCR ou de la moelle épinière reflète parfaitement les changements protéiques de ce phénomène douloureux au niveau du SNC. En effet, bien que la mise en place d'un biomarqueur plasmatique de la douleur dans le milieu vétérinaire soit d'une nécessité en ce moment puisque très peu d'outils fiables et valides sont

disponibles pour mesurer la douleur, l'utilisation d'un biomarqueur sanguin peut sembler plus pratique, mais son interprétation serait moins spécifique à la douleur centralisée. Par contre, les résultats de la mesure de la TTR au niveau sanguin sont plus contradictoires : la TTR plasmatique s'est avérée augmentée chez des patients souffrants de douleur chronique liée à l'arthrite rhumatoïde (Ni et al., 2013) tandis qu'une diminution a été observée chez l'humain quelques heures après une intervention chirurgicale (Fricova et al., 2010). Ces études confirment que les profils obtenus dans la régulation des protéines par neuroprotéomique peuvent différer selon certains paramètres comme le tissu, le fluide ou le modèle animal (Craft et al., 2013). Le même type de variation est observé avec un marqueur bien connu de la douleur : une augmentation de la SP spinale dans des modèles expérimentaux de douleur animale (Beaudry et al., 2006; Pailleux et al., 2014; Pailleux, Lemoine, et al., 2012; Pailleux et al., 2013) a été observée et validé comme un biomarqueur fiable de la douleur animale contrairement à sa mesure au niveau plasmatique (Coetzee et al., 2008). Pour toutes ces raisons, la mesure des biomarqueurs de la douleur s'est donc concentrée dans nos études au niveau du SNC et non pas plasmatique.

### **3.1.3 La TTR est modulée par un amalgame de plusieurs systèmes : nerveux, immunitaire et inflammatoire**

Au niveau plasmatique chez l'humain, une diminution des concentrations de l'homotétramère TTR de 55 KDa dans le sérum est connue pour être liée à une malnutrition (Guerra et al., 2009) ou bien à une infection et la présence d'inflammation (Borish et al., 1992). Bien que la TTR plasmatique soit synthétisée dans le foie par les cellules épithéliales et éliminée par voie hépatique et rénale, elle est également retrouvée dans le LCR suite à sa synthèse dans le SNC par les cellules nerveuses épithéliales du plexus choroïde (Dickson et al., 1985; Soprano et al., 1985) supportant d'autres rôles pour cette protéine avec une demi-vie courte de deux jours autre que celui d'une protéine de transport suite à sa liaison avec la thyroxine (Woeber et al., 1968) et le rétinol (Noy et al., 1992).

La présence de l'ARNm de la TTR dans le SNC a été amplifiée suite à son identification et son extraction dans des cellules neuronales de l'hippocampe et des cellules embryonnaires du cortex en culture primaire (Li et al., 2011) et dans les DRGs et le nerf sciatique de cellules neuronales de souris (Murakami et al., 2010), conférant à la TTR un rôle de neuropeptide. La



TTR est également un neuromodulateur *via* sa capacité enzymatique de cliver le NPY puisque chez des souris déficientes en TTR, les taux du substrat NPY sont augmentés de deux fois dans le SNC (DRG et hippocampe) et associé à une augmentation d'une fois et demie des concentrations en SP, supportant un rôle de modulation impliquant d'autres neuropeptides dans le SNC par la TTR (Nunes et al., 2006).

En plus d'être une protéine de haut poids moléculaire permettant d'émettre l'hypothèse que la TTR ne passait pas la barrière hématoencéphalique, l'identification récente de son ARNm dans les neurones du SNC confirme que l'origine de la TTR identifiée et mesurée dans le LCR ou la moelle épinière n'est pas d'origine plasmatique, rejetant par le fait même l'hypothèse de contamination des échantillons de LCR ou de moelle épinière par le sang périphérique lors des prélèvements de nos échantillons.

Les résultats de nos études pour des modèles expérimentaux différents d'induction de douleur (viscérale, inflammatoire neurogène et douleur chronique centralisée) supportent le développement de sensibilisation douloureuse (allodynie et hyperalgésie) et d'inflammation dont l'intensité de douleur a été modulée selon l'administration de différentes doses d'analgésiques et d'anti-inflammatoires avec des mécanismes d'actions intracellulaires différents. Les effets des modèles animaux sur l'intensité de douleur tout comme les niveaux d'analgésie produits par les molécules chimiques administrées à ces animaux ont été détectés par des concentrations spinales différentes de la TTR, appuyant cette protéine comme un biomarqueur potentiel de douleur au niveau du SNC.

En plus de ses effets neuroprotecteurs (Fleming et al., 2007), la TTR a montré des effets anti-inflammatoires endogènes par l'inhibition dans le sérum de la production constitutive d'IL-1 $\beta$  par les cellules endothéliales et confirmé *in vitro*, par la capacité de la TTR à inhiber la libération de cette cytokine des monocytes suite à une stimulation par l'endotoxine pyrogène, le LPS (Borish et al., 1992). Au niveau cellulaire, TTR se fixe aussi à RAGE, une molécule à la surface cellulaire membre de la superfamille des immunoglobulines. Cette liaison induit l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B induisant une série de cascades d'évènements inflammatoires, immunitaires et de proliférations cellulaires ou apoptotiques (Sousa et al., 2000).

Dans le modèle de douleur viscérale bovine, la régulation de la TTR a été modifiée (augmentée) suite à une administration d'AINS dans le groupe avec le niveau de douleur élevé

puis validée dans le modèle canin avec les propriétés anti-inflammatoires du biphosphonate par un relâchement aussi de TTR spinal. La TTR a également été modulée par la douleur et les composés analgésiques dans les modèles rongeurs. Ces résultats indiquent clairement que la TTR peut être un biomarqueur potentiel de la douleur de type inflammatoire et conséquemment, modulable suite à l'administration d'agents anti-inflammatoires. Ces études supportent nos résultats de l'identification, de la modulation et de l'utilisation de la TTR comme biomarqueur de la douleur *via* la neuroprotéomique comme étant un outil de mesure de la douleur fiable et valide permettant d'identifier et mesurer des marqueurs spécifiques de la sensibilisation centrale. Les changements de la TTR sont concomitants avec ceux de l'hypersensibilité douloureuse dans ces modèles expérimentaux de douleur animale.

### **3.1.4 Conclusion sur la TTR, limitations et perspectives**

Les résultats de ces études supportent la TTR comme un marqueur potentiel de douleur et du bien-être animal spécifique selon l'espèce, selon le type de douleur et modulable suite à l'administration d'agents pharmacologiques ciblant les voies de la douleur.

Ces études supportent la possibilité d'identifier, de moduler et d'utiliser la TTR comme biomarqueur de la douleur *via* la neuroprotéomique comme étant un outil de mesure de la douleur fiable et valide permettant d'identifier et mesurer des marqueurs spécifiques de la sensibilisation centrale. Les changements de la TTR sont concomitants avec ceux de la sensibilisation douloureuse dans ces modèles expérimentaux.

Nos résultats de la découverte de la TTR dans ces modèles expérimentaux de douleur viscérale bovine et arthrosique canine ainsi que rongeur permettent donc de répondre positivement aux problématiques énumérées dès le départ, i) à iv), respectivement : oui, il est possible d'identifier de nouveaux marqueurs de la douleur à composante neuropathique comme il a été le cas avec la TTR; oui, la sensibilisation centrale peut être quantifiée, entre autres, par la quantification de neuropeptides tels que la SP et la TTR; oui, les modèles animaux miment bien la douleur afin d'élucider les mécanismes sous-jacents par la détection d'hypersensibilisation périphérique et centrale; oui, la neuroprotéomique est une méthode spécifique et sensible afin de caractériser et quantifier la douleur de concert avec les méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur. Les objectifs ont donc été atteints : i) caractériser les atteintes du protéome spinal en fonction du niveau de douleur perçu par l'animal a été possible

tout comme l'objectif ii) d'identifier le (les) marqueur (s) potentiellement modulé (s) par l'hypersensibilisation nociceptive dans des modèles expérimentaux de douleur bovine, canine et murine. De par cette découverte, les hypothèses de recherches ont donc été confirmées, c'est-à-dire : i) la réponse à l'hypersensibilisation peut être détectée, élucidée et quantifiée, particulièrement au niveau du protéome spinal et que ii) une gestion adéquate de la douleur atténue l'hypersensibilisation et ses conséquences morbides.

Une limitation de l'utilisation de la TTR et de sa validation dans différents modèles animaux pour l'instant requiert sa mesure concomitante avec d'autres neuropeptides spinaux afin de mieux comprendre sa régulation. De plus, la mesure objective d'un neuropeptide simultanément avec le développement de sensibilisation centrale permet d'augmenter la validité et la fiabilité d'autres méthodes d'évaluation dites plus subjective de la douleur. Malgré la possibilité de quantifier la TTR dans nos modèles rongeurs et par la suite, l'indisponibilité du matériel d'immunodosage commercialement disponible pour cette espèce animale, il n'en reste pas moins que la synthèse d'un ou de plusieurs fragments de la TTR comme standard interne afin de quantifier par spectrométrie de masse cette protéine est à envisager par le laboratoire dans les études futures de la mesure de la douleur centralisée. Il serait également intéressant de vérifier la modulation de la TTR dans d'autres fluides biologiques utilisant des méthodes de collectes moins invasives.

## **3.2 Phase de validation de l'utilisation de la neuroprotéomique afin d'évaluer l'impact de la douleur chronique dans le protéome spinal en partenariat avec le développement d'outils d'évaluation fonctionnelle de mesure de la douleur**

### **3.2.1 Résumé des résultats de recherche utilisant le modèle chimique d'induction de la douleur chronique liée à l'arthrose**

La qualité des méthodologies d'évaluation de la douleur est une pierre angulaire des études précliniques ciblant de nouveaux analgésiques (Edwards et al., 2005; Mao 2009; Mogil et al., 2004; Vierck et al., 2008). Il est donc crucial d'opter pour les méthodes les plus adaptées à une condition spécifique. Pour ce faire, la validité concomitante de différentes méthodes

d'évaluation de la douleur fonctionnelle et neuroprotéomique a été testée dans un modèle rongeur d'induction chimique (MIA) de douleur liée à l'arthrose (Publication 2.3). Le premier objectif de cette étude était dans un premier temps, d'établir la fiabilité d'un éventail de méthodes d'évaluation de la douleur (y compris des tests réflexifs, spontanés et opérants) chez des rats normaux ainsi que l'influence des conditions environnementales, c'est-à-dire, l'acclimatation et les conditions expérimentales de manipulation (observateur, cycle circadien inversé et exercice). Le deuxième objectif consistait à utiliser les méthodes les plus fiables afin de caractériser la douleur dans le modèle rongeur d'induction chimique (MIA) d'arthrose, tout en effectuant une validation simultanée des méthodes d'évaluation de la douleur par rapport à l'expression de différents neuropeptides spinaux et leur régulation suite à un traitement IA de lidocaïne. Les résultats de cette étude suggèrent effectivement que les méthodes d'évaluation de la douleur utilisant le modèle MIA doivent être sélectionnées et planifiées de manière appropriée. Dans cette étude, seule la sensibilité mécanique (Randall-Selitto) avait des propriétés métrologiques médiocres tandis que toutes les autres méthodes étaient répétables dans différentes conditions environnementales (aucun effet des différentes conditions expérimentales de manipulation).

Le protocole d'acclimatation le plus fiable comprenait cinq évaluations sur deux semaines. La sensibilisation douloureuse induite par le MIA liée à l'arthrose a été détectée par l'évaluation de l'allodynie tactile (diminution des seuils de retrait), la capacité d'exercice (diminution), une modification de la distribution de la charge pondérale statique (moins de poids sur la patte douloureuse) et le test opérant (diminution du temps passé du côté noir stimulant la patte douloureuse). Le test opérant a été le plus réactif et sensible à détecter des effets analgésiques de la lidocaïne IA (augmentation de 17 %), suivi par la sensibilité tactile, alors que la distribution pondérale statique avait une certaine limitation de sensibilité. Le test du rotarod n'a pas atteint une sensibilité suffisante pour détecter la douleur arthrosique induite par l'injection de MIA chez le rat et ne peut pas être inclus dans les études futures. La quantification des neuropeptides spinaux à la fin de l'expérience nous a permis de valider de manière plus objective l'effet du traitement positif de la lidocaïne (même si seulement ponctuels, à 7, 14 et 21 jours post-injection de MIA) suite au développement de douleur par l'injection de MIA par une diminution de 34 fois des taux de SP et de 20 fois du CGRP. De plus, les niveaux de neuropeptides accrus soutiennent évidemment la sensibilisation centrale observée dans le modèle de rat MIA par une sur-régulation importante de SP et CGRP. Les résultats actuels

mettent l'accent sur le potentiel de ces neuropeptides en tant que biomarqueurs pharmacologiques pour les tests analgésiques en association avec des méthodes d'évaluation fonctionnelle.

La seconde étude (Publication 2.4) prospective, randomisée, en aveugle et contrôlée portait sur le même modèle MIA, mais utilisant deux doses différentes de cet agent chimique. Cette étude avait pour objectif de caractériser la modulation temporelle de quatre neuropeptides spinaux (SP, CGRP, BK et SST) et de déterminer leur expression potentielle comme biomarqueurs de la douleur par rapport à l'évaluation fonctionnelle de la douleur et à la gravité des lésions du cartilage de l'articulation ipsilatérale. L'injection de MIA s'est traduite par une augmentation de la régulation spinale de ces neuropeptides de même qu'un développement de sensibilité tactile associée à de l'allodynie secondaire. Le sacrifice temporel des rats arthrosiques induits avec la dose la plus élevée de MIA a montré une sur-régulation du CGRP, de la BK et de la SST atteignant son maximum dès sept jours suivant l'injection IA de MIA et une augmentation progressive dans le temps pour la SP plafonnant à la toute fin de l'étude. Aucune différence des taux spinaux des neuropeptides entre les deux doses de MIA utilisé n'a été notée sauf une plus grande concentration spinale de SST pour la dose la plus élevée de MIA et avec plus de dommages cartilagineux. La SP et la BK ont été aptes à détecter les effets analgésiques de la lidocaïne par une diminution de leur régulation spinale concomitante avec une diminution de l'allodynie évaluée par la sensibilité tactile (augmentation). Cette étude montre que la modulation des neuropeptides apparaît tôt et confirme que le SNC est une cible attrayante pour la quantification de la douleur chronique liée à l'arthrose.

Pour terminer, la dernière étude (Publication 2.5) portant sur la validation du modèle chimique du MIA chez le rat pour l'induction de douleur chronique liée à l'arthrose, avait pour objectif de déterminer l'intérêt de l'utilisation de la neuroprotéomique par la quantification de ces mêmes neuropeptides spinaux (SP, CGRP, BK et SST) et la sensibilité de cette méthode à détecter l'efficacité analgésique d'un traitement avec la PGB (en administration préventive avec comparaison à un contrôle négatif ou en administration curative en comparaison avec un opioïde et un AINS), un modulateur de la sensibilisation centrale *via* le blocage des canaux calciques voltage-dépendants. Par le fait même, cette étude visait aussi à valider le développement de la sensibilisation centrale dans ce modèle chimique suite à la détection simultanée des effets d'une

administration de PGB par des évaluations fonctionnelles (spontanées, sensorielles et opérantes) et la quantification neuroprotéomique.

La quantification neuroprotéomique a été une méthode apte à détecter les effets analgésiques de la PGB administrée de façon préventive, induisant une abolition d'une sur-régulation des neuropeptides spinaux induite après l'injection IA de MIA. Cette diminution de la sensibilisation centrale par la PGB préventive a également été notée par un renversement de l'asymétrie de la charge pondérale statique et une diminution de l'allodynie tactile. Par contre, une administration curative de PGB des rats MIA n'a pas permis de contrecarrer l'asymétrie de distribution du poids corporel de l'animale, mais une réduction partielle de l'allodynie tactile tout comme une amélioration partielle (contrairement aux rats recevant l'opioïde) également du test comportemental opérant ont été notées. Seule la quantification neuroprotéomique a été une méthode sensible afin de démontrer une diminution des concentrations spinales des marqueurs spinaux. Ces concentrations rejoignent des taux normaux retrouvés chez des rats naïfs pour tous les neuropeptides spinaux suite à l'administration curative de PGB avec le même niveau d'efficacité que les deux autres traitements pharmacologiques. Une fois de plus, cette étude souligne l'importance d'utiliser des méthodes fiables et sensibles comme la quantification neuroprotéomique pour détecter les effets analgésiques d'un composé pharmacologique conjointement avec des évaluations fonctionnelles de la douleur.

### **3.2.2 Justification du choix de l'espèce animale et du modèle expérimental de douleur animale**

Pour la poursuite des travaux (Publications 2.3 à 2.6 et section 2.7) sur la métrologie de la douleur animale sur modèles expérimentaux quant à la validation neuroprotéomique de biomarqueurs spinaux, nous avons opté pour l'espèce animale du rongeur puisque la complexité comportementale du rat permet d'analyser les composantes affectives de la douleur (Johansen et al., 2001) ou l'expression faciale par une échelle de grimace (Sotocinal et al., 2011). La douleur est un phénomène complexe subjectif et comportemental en réponse à un stimulus nociceptif et une expérience multidimensionnelle intégrant différentes composantes fondamentales telles que sensori-discriminative, motivo-affective, cognitive et comportementale (Apkarian et al., 2005). L'espèce animale choisie doit être en mesure d'exprimer ces changements et ceux-ci doivent être détectables comme c'est le cas avec le

rongeur. Malgré le fait que chez l'humain les molécules impliquées dans la signalisation moléculaire et les phénomènes physiologiques liés à la douleur aient des équivalents retrouvés chez les rongeurs, cela ne semble pas suffisant pour assurer une translation adéquate entre les espèces animales (Mogil et al., 2010). En effet, une bonne translation inter-espèce ou le passage fructueux d'une étude préclinique en phase clinique réside aussi dans la validité des modèles animaux et leur mise en œuvre et notamment, il faut être rigoureux dans certaines sphères telles que la nature du modèle, les mesures de la douleur et l'analyse des données (Craig 2009).

Le choix du rongeur comme espèce animale permet également de réduire les coûts liés à ces études et facilite les manipulations tout en augmentant la puissance statistique (taille de l'échantillon plus grande). La maximisation du contrôle des facteurs environnementaux (Mogil 2017) du laboratoire afin de diminuer le stress et augmenter la reproductibilité des données est un élément crucial. La douleur est un phénomène biologique pouvant être affectée par le stress et modifier le comportement des animaux se traduisant par une analgésie (Butler et al., 2009) ou une hyperalgésie (Imbe et al., 2006). De plus, pour les rongeurs, puisque le genre de l'expérimentateur est un facteur reconnu pour affecter le degré de nociception de ces animaux, ce sont des manipulateurs de genre féminin qui ont été sélectionnés afin de procéder à toutes les évaluations dans nos études utilisant des rongeurs afin d'éviter l'analgésie pouvant être induite par un manipulateur masculin (Sorge et al., 2014).

Les rongeurs sont également des femelles dans nos travaux puisque la douleur chronique induite dans nos études est celle conséquente à la pathologie de l'arthrose. La douleur étant le principal signe clinique de cette maladie dégénérative des articulations affectant plus de 25 % de la population adulte (Chen et al., 2017) avec une étiologie d'apparition plus élevée pour les femmes (Healey et al., 1985; Neogi 2013), il est donc pertinent et justifié d'étudier les mécanismes de la douleur dans des modèles de sexe femelle. La standardisation de ces facteurs pour nos études augmente donc la translation inter-espèce de nos données et par le fait même, favorise la répétabilité et reproductibilité des données obtenues dans un modèle animal de douleur chronique.

Il est bien établi qu'en plus des dommages directs aux nerfs ou leur dégénérescence, la douleur chronique peut résulter d'une inflammation persistante et se développer en douleur inflammatoire chronique, conduisant à une sensibilisation périphérique et centrale (Ji et al., 2014). La douleur chronique d'origine inflammatoire est présente dans la pathologie de



l'arthrose. L'arthrose se manifeste par des changements morphologiques, biomécaniques, moléculaires et biochimiques au niveau des cellules et de la matrice extracellulaire et conséquemment, d'une libération de neuropeptides spinaux due au développement de sensibilisation centrale (Mease et al., 2011; Latremoliere et al., 2009). C'est la douleur inflammatoire liée à l'arthrose qui est reproduite dans nos modèles rongeurs puisqu'il est bien établi que les modèles animaux sont capables de mimer de façon précise la dégradation du cartilage articulaire dans le temps (Alshami 2014). Nous avons d'abord débuté l'induction d'arthrose avec l'injection d'un agent chimique (Publications 2.3 à 2.5), le MIA, causant la dégradation sélective des composantes de la matrice extracellulaire du cartilage suite à l'inhibition de la glycolyse des chondrocytes (Guzman et al., 2003). La douleur provoquée est rapide (moins d'une semaine) et similaire à celle de l'arthrose (Marker et al., 2012). Par contre, la progression temporelle de la douleur ne suit pas celle de la pathologie clinique (Marker et al., 2012). Cette apparition de la douleur inflammatoire neurogène rapide nous a permis de valider nos méthodes fonctionnelles et neuroprotéomiques de mesure de la douleur centralisée ainsi que l'impact de l'administration de différents agents pharmacologiques analgésiques. Ensuite, pour la dernière étude (Publication 2.6), nous nous sommes dirigés vers le développement et la validation d'un modèle d'induction chirurgicale de l'arthrose et la caractérisation quant à l'impact au niveau du protéome spinal de ce modèle concomitant avec le développement de sensibilisation centrale. Les modèles d'induction chirurgicale d'arthrose prennent en moyenne quatre à huit semaines pour développer un phénotype de douleur et ainsi, imiter la progression post-traumatique de la pathologie humaine plus étroitement (Ruan et al., 2013).

### **3.2.3 Justification de l'utilisation de la moelle épinière entière pour les dosages neuroprotéomiques**

Nous avons opté pour l'utilisation de la moelle épinière entière pour les dosages neuroprotéomiques au lieu de cibler seulement la région du plexus lombo-sacré d'origine L3 à S1 chez le rat innervant les voies neuronales de l'articulation pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la méthode de rinçage avec de la saline du canal rachidien utilisée dans notre étude pour recueillir toute la moelle épinière est rapide et permet la collecte du tissu entier (sans altération visuelle macroscopique) de la moelle épinière comme nous l'avons décrit et montré dans la section 2.7.2.1 de ce manuscrit. Avec l'utilisation de contrôles adéquats, comme par



exemple lors d'une comparaison avec des rats naïfs ou des rats arthrosiques avec ou sans traitement analgésique pharmacologique, il n'y a aucun risque de mesurer des changements dans les concentrations des neuropeptides qui n'ont rien à voir avec la douleur chronique reliée à l'arthrose dans nos modèles rongeurs. Le but étant d'identifier des différences entre des groupes expérimentaux manifestant un état douloureux différent.

Le seul risque auquel on aurait pu être confronté est une "dilution" possible de la concentration en neuropeptides sur l'ensemble de la moelle épinière, mais l'ajout de la solution tamponnée se fait en fonction du poids de la moelle épinière. De plus, nos publications antérieures utilisant des méthodes de mesure sensibles et spécifiques ont clairement démontré que ce n'était pas le cas (Beaudry et al., 2009; Ferland et al., 2011a; Ferland et al., 2011b; Otis et al., 2016; Otis et al., 2017). De plus, en effectuant toujours avec rigueur la même méthode de collecte d'homogénéisation et en traitant toujours nos échantillons d'une façon identique (temps de collecte, congélation rapide, ajout d'inhibiteur de protéase, etc.), si une différence est observée dans la concentration d'un neuropeptide quelconque entre deux groupes d'animaux, il ne fait pas de doute ce résultat fait état d'un niveau de douleur différent.

Il faut aussi rappeler que nous nous concentrons sur l'étude du développement de la sensibilisation centrale liée à la douleur arthrosique, y compris les changements de neuroplasticité qui peuvent survenir dans la région de la moelle épinière à l'extérieur du plexus lombo-sacré. La plasticité neuronale montre que le cerveau est un système dynamique en perpétuelle reconfiguration (Ploner et al., 2011). Il est bien établi que suite à des lésions périphériques, des changements morphologiques complexes sont engendrés dans toutes les composantes (y compris sur ou sous expression des neuropeptides et leurs récepteurs tout comme les seconds messagers, etc.) du système nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière (Woolf 1983). Ces changements protéiques sont responsables de l'activation cellulaire à long terme conduisant à une neuroplasticité centrale qui pourrait expliquer, entre autres, la chronicité de la douleur et les phénomènes de mémorisation. Ainsi, quantifier les neuropeptides dans la moelle épinière entière est tout à fait justifié dans nos études en raison des effets à long terme également des traitements pharmacologiques analgésiques testées, comme par exemple la prégabaline, sur la concentration intracellulaire des neuropeptides en diminuant la synthèse peptidique à long terme et non seulement la concentration extracellulaire.

De plus, une étude a montré que peu importe le type de modèle d'induction de la douleur liée à l'arthrose (MIA, CCLT ou DMM), l'expression des gènes et la régulation de médiateurs de la douleur et des neuropeptides, comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , le CGRP, la SP, le NPY et la galanine, ne varie pas au niveau des DRGs (Im et al., 2010). De plus, cette étude a aussi rapporté aucune différence dans la régulation et l'expression de ces composés indépendamment de la localisation des DRGs et les sections spécifiques étudiées (bilatéraux [L1 / L2 (L1), L2 / L3 (L2), L3 / L4 (L3), L4 / L5 (L4), L5 / L6 (L5) et S1 (L6 / S1)]) (Im et al., 2010). Ceci suggère donc des profils d'expression de gènes similaires dans l'ensemble des DRGs supportant des mécanismes de douleur neuropathique qui semblent être fondamentaux pour l'étiologie de l'arthrose, indépendamment de la biologie des modèles dans lesquels l'arthrose est initiée. Les changements dans les DRGs des neurones peuvent représenter des réponses des corps cellulaires à des stimuli dommageables pour les fibres nerveuses dans le tissu ou le neurone en périphérique. De plus, l'expression des neuropeptides SP et CGRP était diminuée dans les DRGs suite à une invasion par les macrophages liés à l'inflammation et typique aussi d'une douleur neuropathique (Hu et al., 2002; Hu et al., 2007).

### **3.2.4 L'importance de la validation des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur chez des rats sains**

Il est bien établi que la douleur est un phénomène complexe et la mesurer reste un défi en soi. L'une des failles pointée du doigt dans le manque de translation lors d'études sur la découverte d'analgésique, est l'absence de validité des méthodes d'évaluation (Mogil 2009). La crédibilité d'une méthode ou d'un instrument de mesure repose sur la fiabilité des mesures lors de la répétition du test et sa validité dans l'interprétation et l'utilisation de la mesure (Cohen et al., 2008). Avant de valider nos méthodes d'évaluation de la douleur dans un modèle expérimental rongeur de douleur animale, on s'est penché à savoir si ce type de validation avait été réalisé sur des rats sains et la réponse est non. Il devenait donc pertinent de mettre en évidence les méthodes les plus reproductibles et les plus répétables ainsi que d'identifier les facteurs environnementaux pouvant affecter les réponses comportementales des rongeurs. Les facteurs environnementaux dans le laboratoire de recherche ont un rôle important à jouer dans la reproductibilité et la translation des données (Mogil 2017). On a vérifié si les facteurs environnementaux tels que le cycle circadien, le niveau d'expertise, l'identité de l'évaluateur et

l'activité motrice pouvaient influencer ou non la validité de nos méthodes d'évaluation fonctionnelle. Le cycle circadien (Castellano et al., 1985; Perissin et al., 2003), le manipulateur (Sorge et al., 2014) et l'exercice (Moreau et al., 2013) peuvent influencer la sensibilité à une réponse douloureuse pour des animaux. Nous avons montré que pour des rats sains, aucun de ces facteurs n'a affecté la reproductibilité qui s'est montrée excellente de nos données, donc les choix initiaux de ces facteurs étaient optimaux compte tenu de l'objectivité des tests prioritaires.

L'utilisation du calcul de l'ICC est un indice de choix afin de vérifier la fiabilité d'une méthode (Gelinas et al., 2008; Goodwin 2002). De toutes les méthodes étudiées, celle qui a montré la plus faible répétabilité avec une très grande variabilité inter-individu chez nos rats sains selon son ICC est celle de l'évaluation de la sensibilité mécanique à l'aide du test Randall-Selitto. La piètre qualité métrologique de l'évaluation de l'hyperalgésie mécanique secondaire par le Randall-Selitto a été identifiée auparavant dans un modèle de douleur arthrosique par l'incapacité à démontrer des différences dans les seuils de retrait d'animaux de groupes opposés (Sham *versus* chirurgie) (Bove et al., 2006) puis confirmé chez des rats sains dans notre étude. Cette technique requiert d'immobiliser le rat, induisant un stress considérable et rendant les résultats difficilement interprétables. Cette méthode a donc été retirée de nos protocoles de recherche pour les autres études.

D'un autre côté, la méthode d'évaluation de la sensibilité tactile par le von Frey et la mesure statique de la distribution de la charge pondérale ont généré des résultats répétables en considérant une acclimatation au dispositif d'au moins une semaine pour ces deux tests ainsi que la pratique d'exercice pour une amélioration de la mesure statique. La pratique d'un exercice est reconnue chez l'espèce féline pour sa capacité à bonifier la répétabilité d'une mesure (Moreau et al., 2013). Le protocole d'acclimatation le plus fiable induisant le moins de variations dans les méthodes d'évaluation s'est avéré celui basé sur deux semaines et comportant cinq périodes d'évaluation. Il ne fait pas de doute que ces résultats mettent de l'avant l'importance d'une période d'acclimatation afin de réduire le stress (et conséquemment éviter une analgésie ou une hyperalgésie non spécifique (Butler et al., 2009; Imbe et al., 2006)) de l'animal par une familiarisation adéquate à l'appareil, au changement de locaux et aux manipulations de l'expérimentateur et conséquemment, augmenter la validité, la fiabilité et la répétabilité de la mesure.

La sensibilité du test opérant (paradigme du comportement d'échappement / évitement) a été validée et s'est avérée apte à détecter des effets analgésiques chez le rat dans un modèle de douleur inflammatoire (Boyce-Rustay et al., 2010), mais il n'a jamais été testé pour des rats sains. Sachant que le rat préfère naturellement les zones ombragées, il devenait indispensable de démontrer sa préférence pour le côté noir et la bonne répétabilité de cette méthode que nous avons obtenue.

Les résultats de cette phase de validation supportent l'importance de valider chez des sujets sains des méthodes d'évaluation et la pertinence de chacune de leur utilisation afin de générer un protocole optimal afin de mesurer les multiples facettes du phénomène de la douleur. Cependant, la principale limitation de cette étude était la petite taille de l'échantillon. En outre, il était possible d'augmenter la validité et la fiabilité des méthodes d'évaluation de la douleur avec un protocole d'acclimatation optimal. Les méthodes d'évaluation fonctionnelle retenues afin d'élaborer un protocole pour un modèle expérimental de douleur animale chez le rat comprennent l'évaluation de la sensibilité tactile, la mesure statique de distribution de la charge pondérale (spontanée), le test opérant puis une acclimatation à ces appareils comprenant cinq jours non consécutifs sur deux semaines.

### **3.2.5 L'utilisation du MIA IA est un modèle de douleur lié à l'arthrose permettant la validation des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur inflammatoire neurogène concomitante avec les méthodes neuroprotéomiques**

La validité ainsi que la sensibilité métrologique des méthodes d'évaluation algésimétrique et biomécanique de la douleur ont ensuite été évaluées sur un modèle de douleur arthrosique (*via* l'injection IA de MIA) murin. L'impact au niveau du protéome spinal des différents stades de la douleur arthrosique générée par le MIA IA ainsi que son expression temporelle ont été évalués.

#### **3.2.5.1 Le MIA induit le développement de sensibilisation centrale**

L'augmentation de la sensibilité tactile par une diminution des seuils de retrait suite à une stimulation par un filament von Frey, l'asymétrie de distribution du poids total de l'animal

par une diminution de la quantité de poids appuyé sur le membre lésé ainsi que la diminution du temps passé du côté noir lors de l'évaluation du test opérant (Publications 2.3-2.5) supportent le développement de sensibilisation périphérique et centrale suite à l'injection IA de MIA dans nos études.

Les effets que nous avons notés avec le MIA étaient beaucoup plus présents et apparents avec la dose élevée (2 mg), notamment avec un développement de sensibilité tactile plus grand et la présence de lésions macroscopiques plus importantes. Il est bien établi que les effets structuraux d'une injection IA de MIA apparaissent progressivement et de façon dose-dépendante et selon deux phases de développement de douleur (Bove et al., 2003; Pomonis et al., 2005). La première phase étant d'origine inflammatoire (maximum atteint trois jours post-induction) avec une durée moyenne de sept jours. Par la suite, la phase inflammatoire s'atténue et les changements dégénératifs relatifs à la mort cellulaire des chondrocytes progressent afin de laisser apparaître la phase de douleur chronique variant selon la dose et le volume injecté (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997; Pomonis et al., 2005). En effet, un marqueur de lésion neuronale, le facteur de transcription activant de type 3 a été observé plus tardivement (entre 8 et 14 jours) dans le modèle MIA (Ivanavicius et al., 2007). Nos résultats suggèrent que le modèle MIA utilisé à une dose élevée (2 mg) est un modèle expérimental de la douleur susceptible de permettre l'étude des effets analgésiques de composés pharmacologiques ciblant l'inflammation neurogène et la douleur centralisée. Il a été démontré que le modèle MIA produit une hyperalgésie et une allodynie mesurables (Fernihough et al., 2004).

Nos résultats des évaluations fonctionnelles de la douleur dans ce modèle de douleur supportent ces observations et confirment que le phénomène inflammatoire induit par le MIA produit une hyperalgésie primaire (sensibilisation périphérique au niveau de la lésion) et secondaire, reflétant une hyperexcitabilité centrale (Latremoliere et al., 2009) mesurable. Nos méthodes d'évaluation de la douleur (y compris des tests réflexifs, spontanés et opérants) sont des méthodes sensibles, fiables et valides afin de détecter le phénomène douloureux de type arthrosique induit suite à l'injection de MIA. Nos résultats et la validation des méthodes permettent de mesurer les changements générés par le modèle MIA sur les différentes composantes sensori-discriminative (test réflexif et spontané) et émotive-comportementale (test opérant) de la douleur. Un bon modèle animal doit être en mesure de bien exprimer ces

changements aux niveaux des différentes composantes de la douleur afin de permettre une bonne translation (Mogil 2009) et nos résultats supportent cette affirmation.

### **3.2.5.2 La neuroprotéomique est un outil de mesure fiable, valide et sensible de la douleur chronique liée à l'arthrose suite à une injection IA de MIA**

Cette sensibilisation centrale dans le modèle MIA notée par les évaluations fonctionnelles de la douleur a été validée par la libération de neuropeptides spinaux notamment de CGRP et de BK dès trois jours (confirmant la phase initiale de douleur inflammatoire par le MIA) suivant l'induction de douleur arthrosique, mais plus marquée et soutenue après la première semaine pour la SST et après deux semaines pour la SP, lors du début du développement de la douleur chronique dans la deuxième phase. Ceci reproduit la régulation des neuropeptides nociceptifs observée précédemment (Ferland et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la neuroprotéomique est une méthode apte à détecter l'hypersensibilité douloureuse induite par le MIA par des modifications des concentrations de ces neuropeptides suite à une modification de leur régulation dans la moelle épinière. Les augmentations de biomarqueurs spinaux tels que la SP et le CGRP ont été observées précédemment dans le modèle MIA (Ferland, Pailleux, et al., 2011) et confirmées par immunohistochimie dans un modèle d'arthrose par injection d'un adjuvant (Ahmed et al., 2010) ou de MIA (Ahmed et al., 2012). Une autre équipe a déjà démontré aussi une augmentation des concentrations de CGRP, de BK, et de glutamate, mais pas de SP suite à une injection de MIA par rapport à des rats naïfs, mais sans toutefois préciser le temps de suivi des rats (Puttfarcken et al., 2010).

Il est bien établi que le phénomène de sensibilisation centrale génère la libération de neuropeptides dans la moelle épinière participant donc à l'amplification de l'excitabilité des neurones (Latremoliere et al., 2009; Le Bars et al., 2002; Woolf 1983). Il ne fait pas de doute que le MIA dans nos études engendre l'activation des fibres C afférentes peptidergiques, ce qui entraîne une sensibilisation centrale. L'expression accrue des neurotransmetteurs excitateurs, tels que le CGRP et le SP, dans les terminaux centraux des afférences nociceptives primaires est associée à une activation des fibres C et conséquemment, à une transmission facilitée de l'état de sensibilisation (Abaei et al., 2016; Harvey et al., 2009; Woolf 1996), comme celle induite par une injection de MIA (Bullock et al., 2014). Cette sensibilisation centrale par le MIA a été bien démontrée également par une expression relative croissante de l'ARNm de gènes

cibles comme ceux des cytokines pro-inflammatoires de l'IL-1, du TNF et des médiateurs de la douleur tels que la SP, le CGRP, le NPY et la galanine (Im et al., 2010).

Des concentrations élevées de BK montrent que ce neuropeptide augmente les courants glutaminergiques évoqués par les afférences primaires dans la moelle épinière, ce qui suggère que, outre le rôle documenté de la BK dans la sensibilisation périphérique, elle joue également un rôle dans la sensibilisation centrale (Puttfarcken et al., 2010) et nos résultats supportent cette observation. Il est intéressant aussi de noter que la SST est reconnue comme un neuromodulateur inhibiteur de la douleur et c'est le seul neuropeptide qui a été en mesure de distinguer une différence dose/effet de l'injection de MIA suggérant une plus grande implication de la voie inhibitrice de la douleur avec la dose supérieure (2 mg) conjointement avec plus de dommages cartilagineux. La SST diminue l'excitabilité neuronale induisant ainsi des effets analgésiques (Gaumann et al., 1988).

La neuroprotéomique confirme bien que l'injection de MIA induisant une dégénérescence articulaire chez le rat est un modèle adapté pour l'étude des voies de la douleur nociceptive causée par l'arthrose. En effet, en raison des altérations du SNC et des nerfs périphériques qui innervent les articulations, la douleur associée au MIA développe progressivement les caractéristiques de la douleur neuropathique (Ivanavicius et al., 2007). Dans l'ensemble, cela fournit d'autres preuves clés *in vivo* que la douleur arthrosique est causée par une sensibilisation centrale *via* la communication entre les nocicepteurs périphériques et le système sensoriel central (Abaei et al., 2016; Zhang et al., 2013).

Les résultats neuropeptidomiques de nos études concernant l'évolution temporelle de la concentration des différents neuropeptides par une libération spinale dès trois jours post-injection de MIA concomitante avec l'apparition et le profil d'évolution de l'allodynie tactile répondent parfaitement à l'un des défis majeurs présentement de la découverte de nouveaux marqueurs fiables afin de quantifier la douleur (Hayes et al., 2014) et permettant aussi d'augmenter la validité associée aux mesures réflexes (Mogil 2009).

### **3.2.5.3 L'injection de saline IA n'est pas neutre**

Par contre, nous avons montré que l'injection de saline IA induit une hyperalgésie ou une allodynie dans nos rats sham par le développement de sensibilité tactile et notée aussi par des changements dans le test opérant. Ceci a été confirmé et validé objectivement par une



modification (augmentation) de la régulation significative des concentrations spinales de SP, CGRP et SST par neuroprotéomique dans ces rats sham comparativement à des rats naïfs. Il a été observé ultérieurement qu'une injection IA de saline dans un modèle de souris transgénique augmente l'activité de la voie NF- $\kappa$ B trois et sept jours post-injection (Bowles et al., 2014). Dans le modèle MIA de ces mêmes souris transgéniques, la cinétique temporelle de l'activité de NF- $\kappa$ B était fortement corrélée avec l'allodynie mécanique et les taux sériques de l'IL-6 dans la phase inflammatoire (jour trois) alors que l'IL-1 $\beta$  sérique l'était plus tardivement avec la sensibilité douloureuse de la phase de douleur chronique de la maladie (Bowles et al., 2014). Notre hypothèse que l'injection IA de saline n'est pas totalement neutre a été indirectement confirmée par une administration de la PGB dans ce groupe à inhiber le développement de toute sensibilité tactile et validée avec des concentrations plus faibles des quatre neuropeptides. Les gabapentinoïdes tels que la PGB sont des molécules efficaces à moduler négativement la transmission spinale nociceptive par le blocage de canaux calciques voltage-dépendants (Field et al., 1997). Ceci suggère que suite à une injection IA d'un certain volume d'une solution quelconque, il en résulte une augmentation de pression et d'inflammation neurogène liée à cette intervention. Sur la base de ces résultats, un groupe témoin neutre (sans injection IA) est donc nécessaire.

#### **3.2.5.4 Le MIA est un modèle expérimental de douleur permettant l'étude d'agents pharmacologiques analgésiques**

Après avoir validé que le modèle MIA induit de la sensibilisation centrale et que la neuroprotéomique est une méthode fiable, spécifique, valide et sensible afin de mesurer l'hypersensibilisation douloureuse permettant d'augmenter la validité des méthodes fonctionnelles de la douleur, nous avons donc évalué les impacts au niveau des évaluations fonctionnelles et du protéome spinal suite à l'administration de différents traitements pharmacologiques : lidocaïne IA, prégabaline en traitement préventif ou curatif *per os*, morphine ou carprofène en traitement curatif sous-cutané, avec la dose la plus élevée de MIA IA.

Le choix des doses pour les traitements préventifs et curatifs de nos études ne s'est pas fait de façon arbitraire. En effet, malgré que ce n'était pas le but principal ici de tester des doses analgésiques multiples et les réponses comportementales qui leur sont associées, nous savons



que dans un contexte de recherche dose-réponse, il s'agit d'une étape importante à franchir afin de respecter les bonnes pratiques de laboratoire. Nous avons donc choisi des schémas posologiques de ces analgésiques selon des publications antérieures en respectant une posologie usuelle standard pour une utilisation chez le rongeur dans le but d'obtenir une efficacité analgésique maximale, mais tout minimisant les effets secondaires. De plus, ces choix ont été soutenus aussi par notre expérience professionnelle en tant que vétérinaire ayant une expérience dans les animaux de laboratoire depuis plus de 20 ans. Les références multiples soutenant la sélection des doses pour chaque analgésique se retrouvent dans la publication 2.5 et plus spécifiquement, dans les sections 2.5.4.2.1 et 2.5.4.2.2.

Brièvement, pour la prégabaline, on a d'abord opté pour une dose quotidienne de 50 mg/kg, mais compte tenu que plusieurs rattes ont montré des effets secondaires de style pica qui ont nécessité des interventions vétérinaires, nous avons donc été contraint à réduire cette dose à 30 mg/kg. Cette nouvelle dose s'est néanmoins révélée efficace, sans d'effets secondaires quelconques, et le choix a été fait selon des études antérieures qui avaient démontré préalablement des effets bénéfiques analgésiques mesurables avec une administration ponctuelle (Fernihough al., 2004; Ivanavicius et al., 2007; Rahman al., 2009) ou une série d'administration (Mangaiarkkarsi et al., 2015). Ce fût le même raisonnement pour le choix des doses des deux autres analgésiques. Pour la morphine, une dose standard journalière de 6 mg/kg, qui est une posologie normale pour le rongeur, sécuritaire et démontrant des effets antinociceptifs (Ferreira-Gomes et al., 2012; Fernihough et al., 2004; Nagase et al., 2012) tout comme pour le carprofène 5 mg/kg (Roughan and Flecknell, 2001).

Il est bien connu que le modèle MIA est un modèle populaire et reconnu afin d'évaluer le potentiel analgésique d'un composé pharmacologique (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014). Nos résultats des évaluations fonctionnelles et neuroprotéomiques ont montré l'évolution et le développement de deux phases distinctes de la douleur. Nos résultats sont en lien avec des études antérieures (Ferreira-Gomes et al., 2012; Ivanavicius et al., 2007; Thakur et al., 2012) qui ont montré que l'activation d'un marqueur de lésion neuronale dans le GRD a considérablement augmentée entre le jour trois et quatorze suite à l'injection de MIA, mais que l'analgésie des AINS atteint un sommet (au jour 14) pour ensuite diminuer en efficacité (Ivanavicius et al., 2007). La présence de gliose (Thakur et al., 2012) conjointement avec la surrégulation de la protéine 43 associée à la croissance dans le ganglion dorsal ipsilatéral suggère

que la lésion axonale est associée à une réponse de régénération (Ferreira-Gomes et al., 2012; Orita et al., 2011).

Ces études, tout comme nos résultats, indiquent que le modèle MIA présente une douleur inflammatoire précoce validée avec la libération hâtive de neuropeptides puis transigeant vers une douleur neuropathique tardive (Zhang et al., 2013) confirmée par un maintien de la sur-régulation spinale de la SP, du CGRP, de la BK puis de la SST. Ceci explique la complexité dans le traitement de la douleur OA. Cette propriété du modèle MIA est particulièrement intéressante lorsqu'on réalise que la plupart des traitements prescrits contre la douleur liée à l'arthrose humaine sont de la classe des anti-inflammatoires (Hayes et al., 2014). En effet, la phase initiale inflammatoire de ce modèle peut être utilisée pour démontrer l'action de diverses molécules ciblant les médiateurs de l'inflammation (Bove et al., 2003; Pomonis et al., 2005; Nagase et al., 2012). La phase tardive de douleur neuropathique quant à elle permet de vérifier l'efficacité de molécules analgésiques variées telles que les opiacés, les inhibiteurs des canaux calciques ou sodiques, etc. (Combe et al., 2004; Fernihough et al., 2004; Nagase et al., 2012; Okun et al., 2012).

Il est intéressant de noter qu'avec le modèle MIA chez les rats, presque toutes les études ont testé la réponse analgésique à l'administration ponctuelle (aiguë) d'AINS (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007; Nagase et al., 2012; Pomonis et al., 2005), mais avec des effets anti-inflammatoires limités à la phase initiale inflammatoire du MIA. On note également l'utilisation d'une administration ponctuelle dans le modèle MIA de morphine (Combe et al., 2004; Fernihough et al., 2004; Nagase et al., 2012; Pomonis et al., 2005), de tramadol (Combe et al., 2004; Nagase et al., 2012), d'amitriptyline (Ivanavicius et al., 2007; Nagase et al., 2012) ou de gabapentine (Fernihough et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007; Nagase et al., 2012). Les résultats de notre étude sont donc innovateurs puisqu'elle considère une administration préventive et/ou curative, mais sur plusieurs jours d'administrations

### **3.2.5.5 La neuroprotéomique est la méthode la plus sensible, fiable et valide afin de détecter l'administration d'agents pharmacologiques analgésiques dans le modèle MIA de douleur chronique liée à l'arthrose**

Nos différentes méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur ont détecté les effets analgésiques de nos différents traitements dans le modèle MIA, mais selon des propriétés

métrologiques différentes. En effet, leur sensibilité était différente selon le type d'analgésique utilisé et le mode d'administration (**Tableau XXI**). Nos résultats sont en lien avec la littérature selon laquelle des résultats analgésiques consistants n'ont été obtenus qu'avec un dosage chronique (répété) du célécoxib (AINS) (Ferland et al., 2011; Pomonis et al., 2005) et ponctuelles (Combe et al., 2004; Fernihough et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007; Nagase et al., 2012; Pomonis et al., 2005) ou chronique (répété sur 5 jours) (Vonsy et al., 2009) d'opioïdes, d'amitriptyline ou de gabapentine. Dans le modèle MIA, nos résultats supportent ces études et il s'avère évident que l'hypersensibilité douloureuse, l'allodynie tactile, l'asymétrie de distribution de la charge pondérale statique et la détérioration du comportement peuvent être renversées par l'administration de traitements analgésiques et validées objectivement avec la mesure des neuropeptides spinaux tels que la SP, le CGRP, la BK et la SST.

Globalement, selon nos résultats des méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur, le test réflexe de la sensibilité tactile a été le test le plus sensible à détecter des effets analgésiques de nos traitements. La lidocaïne (ponctuelle) et la PGB curative sont les deux drogues qui ont montré les moins bonnes propriétés analgésiques avec nos méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur. La faible sensibilité à détecter l'analgésie avec le test de la distribution pondérale statique indique clairement qu'une fois la phase inflammatoire terminée dans le modèle MIA, ce test détecte davantage les altérations biomécaniques que le phénomène douloureux. Une analyse de la démarche cinématique pour les études futures dans notre laboratoire impliquant le modèle rongeur serait à privilégier puisque dans les modèles canins et félins, la mesure des changements dans les pics verticaux de force s'est avérée efficace et valide afin de détecter des effets chondroprotecteurs ou analgésiques d'agents pharmacologiques dans des modèles expérimentaux de la douleur animale (Moreau et al., 2014). Malgré le fait que le test opérant ait démontré de bonnes propriétés métrologiques à détecter les effets de la lidocaïne, il a obtenu de moins bons effets avec la PGB. Il pourrait s'agir d'une erreur statistique de type II, car au cours de la période de suivi des groupes de la PGB, ceux-ci ont présenté un pourcentage de présence aussi élevée du côté noir que les deux groupes placebo, masquant ainsi toute forme de détection d'un effet analgésique.

**Tableau XXI. Sensibilité des différentes méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur suite à l'administration d'analgésiques dans un modèle MIA.**

Méthodes* d'évaluation fonctionnelle	Type d'administration				
	Ponctuelle	Préventive	Curative	Curative	Curative
	Lidocaïne	PGB	PGB	Morphine	Carprofène
Test réflexif	Oui	Oui	Partiellement	Oui	Oui
Test spontané	Non	Partiellement	Non	Partiellement	Oui
Test opérant	Oui	Non	Partiellement	Détérioration	Oui

\* La comparaison est basée sur le groupe MIA 2 mg recevant le placebo.

La faible efficacité de la lidocaïne a également été détectée et validée par une moindre grande diminution des concentrations des neuropeptides spinaux (**Tableau XXII**) contrairement à la PGB en mode préventif. Par contre, pour la PGB curative, contrairement aux résultats des différentes méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur obtenus avec cet analgésique, on constate que l'effet de cet analgésique est bien détecté par une très grande diminution des neuropeptides spinaux avec des taux comparables à ceux d'analgésiques plus standards comme la morphine ou le carprofène. Il ne fait pas de doute que la neuroprotéomique est une méthode sensible et spécifique pour mesurer l'impact au niveau du protéome spinal d'une administration d'agents pharmacologiques analgésiques dans le modèle MIA de douleur liée à l'arthrose et que celle-ci inclut des composantes douloureuses de type inflammatoire et neurogène.

**Tableau XXII. Taux (%) de diminution de la régulation de la concentration des neuropeptides spinaux suite à l'administration d'analgésiques dans un modèle MIA.**

Neuropeptides*	Type d'administration				
	Ponctuelle	Préventive	Curative	Curative	Curative
	Lidocaïne	PGB	PGB	Morphine	Carprofène
SP	19.3	44.8	50.3	44.8	54.3
CGRP	8.7**	39.7	48.3	45.9	40.9
BK	17.5	46.5	48.1	45.8	55.1
SST	11.4**	68.2	67.0	56.3	68.7

\* La comparaison est basée sur le groupe MIA 2 mg recevant le placebo au sacrifice (jour 21).

\*\* Différence non statistiquement significative ( $P > 0.05$ ) comparée au groupe MIA 2 mg placebo.

Nos résultats montrent aussi qu'il est possible de moduler négativement la sensibilisation centrale induite dans le modèle MIA par une administration de PGB et de détecter ces changements avec la quantification des neuropeptides. Les résultats neuroprotéomiques sont conformes au fait que la PGB a un effet analgésique principalement par une diminution de la libération des neuropeptides comme mécanisme principal d'action de cette drogue (Micheva et al., 2006; Takasusuki et al., 2011). Il est reconnu que le MIA est capable d'induire un influx massif de calcium dans le nerf périphérique du rat *in vitro* via l'inhibition du métabolisme (Petrescu et al., 2007; Schmidt et al., 2009) et en opposition, le PGB peut jouer un rôle dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs vésiculaires *in vivo* en se liant au canal calcique voltage-dépendant (Rahman et al., 2015). Comme l'action spinale de la PGB est complétée par une inhibition de la facilitation descendante (Rahman et al., 2009), et le fait que la sensibilisation centrale induite par le MIA est médiée, en partie, par des mécanismes modulateurs descendants (Havelin et al., 2016), ceci pourrait expliquer les principales actions anti-allodymiques et analgésiques de la PGB (Alles et al., 2017; Stahl et al., 2013) observées dans ce modèle.

### **3.2.5.6 Conclusion sur le modèle MIA, limitations et perspectives**

Nos résultats du modèle expérimental murin de douleur induite par le MIA permettent donc de répondre positivement à certaines problématiques énumérées dès le départ, soit ii), iii) et iv), respectivement : oui, la sensibilisation centrale peut être quantifiée, entre autres, par la neuroprotéomique étant une méthode valide et sensible *via* la quantification de neuropeptides tels que la SP, le CGRP, la BK et la SST; oui, le modèle expérimental de douleur animale du MIA mime bien la douleur afin d'élucider les mécanismes sous-jacents puisque ce modèle induit le développement d'inflammation et de douleur neuropathique pouvant être modulé par des agents analgésiques; oui, la neuroprotéomique est une méthode spécifique et sensible afin de caractériser et quantifier la douleur de concert avec les méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur. Les objectifs i) et ii) ont donc été également atteints avec le modèle MIA chez le rongeur qui a permis de : i) caractériser les atteintes du protéome spinal en fonction du niveau de douleur perçu par l'animal tout comme l'objectif ii) d'identifier le (les) marqueur (s) potentiellement modulé (s) par l'hypersensibilisation nociceptive dans des modèles expérimentaux de douleur murine. De par cette découverte, les hypothèses de recherches ont

donc été confirmées aussi avec le modèle MIA, c'est-à-dire : i) la réponse à l'hypersensibilisation peut être détectée, élucidée et quantifiée, particulièrement au niveau du protéome spinal et ii) qu'une gestion adéquate de la douleur atténue l'hypersensibilisation et ses conséquences morbides.

Bien que le modèle MIA permet le criblage rapide de l'efficacité analgésique de composé pharmacologique et cause une douleur similaire à l'arthrose en moins d'une semaine, il ne suit pas la progression temporelle de la pathologie clinique (Marker et al., 2012). Nous avons montré que le modèle MIA est un modèle pouvant mimer la sensibilisation centrale associée à la douleur arthrosique. Par contre, ce modèle ne permet pas l'étude à long terme de l'efficacité de composés pharmacologiques analgésiques puisque les valeurs reviennent en moins de trois semaines à des seuils de base, en particulier pour la distribution pondérale statique. Les méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur concomitante avec la neuroprotéomique sont des outils fiables, valides et sensibles permettant la détection du phénomène douloureux dans ce modèle. Par contre, nos résultats suggèrent et soutiennent que les méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur ne peuvent pas à elles seules permettre de stipuler sur le niveau d'efficacité d'un agent analgésique dans le modèle MIA dû à une plus grande variabilité compte tenu d'un certain degré de subjectivité des méthodes fonctionnelles. L'utilisation de la neuroprotéomique s'est avérée la méthode la plus sensible, fiable et valide avec le QST de l'allodynie tactile dans le modèle MIA pour la détection de l'hypersensibilité douloureuse et des différents effets analgésiques des traitements pharmacologiques testés. Les différences observées entre les analgésiques sur les résultats fonctionnels sont étayées par différentes influences sur les concentrations des neuropeptides spinaux. Cela souligne l'intérêt et suggère l'utilisation des évaluations complémentaires neuroprotéomiques dans l'établissement de la valeur analgésique préclinique de toute molécule pharmacologique à tester.

### **3.2.6 Résumé des résultats de recherche utilisant le modèle chirurgical d'induction de la douleur chronique arthrosique**

Dans le but d'augmenter la validité et la fiabilité de notre modèle expérimental de douleur liée à l'arthrose et de respecter notre optique de recherche translationnelle, nous avons élaboré un modèle chirurgical d'induction de douleur chronique qui est reconnu pour développer

un phénotype de douleur imitant la progression post-traumatique de la pathologie humaine plus étroitement (Ruan et al., 2013). En effet, le modèle chimique nous a permis de valider et développer rapidement des méthodes d'évaluation de la douleur et de mesurer les effets analgésiques de molécules pharmacologiques, mais il est bien établi que ce modèle ne suit pas la progression temporelle de la pathologie clinique (Marker et al., 2012). Pour la dernière étude (Publication 2.6), nous nous sommes donc dirigés vers le développement et la validation d'un modèle d'induction chirurgicale de la douleur arthrosique et la caractérisation quant à l'impact au niveau du protéome spinal de ce modèle concomitant avec le développement de sensibilisation centrale.

Cette étude pilote chez le rat avait pour objectif de comparer trois modèles chirurgicaux (déstabilisation du ménisque médial (DMM), transection du ligament croisé crânial (CCLT) et la combinaison des deux (CCLT-DMM)) et un chimique (MIA IA) d'induction de douleur arthrosique quant à leurs conséquences sur les évaluations fonctionnelles de la douleur et sur les concentrations des neuropeptides spinaux. La combinaison du modèle chirurgical CCLT-DMM et le modèle MIA ont tous les deux induits des altérations fonctionnelles dans la mesure de la distribution de la charge pondérale statique de la patte lésée (diminution marquée du poids appuyé) pour les deux premiers temps d'évaluation (comparativement seulement au premier temps pour les deux autres modèles chirurgicaux). Le modèle DMM n'a pas montré d'asymétrie de distribution de la charge pondérale et le CCLT seulement au premier temps d'évaluation comparativement aux valeurs avant l'induction de la douleur arthrosique. Les trois modèles chirurgicaux ont induit de l'allodynie tactile secondaire de la patte lésée tout comme le MIA, mais de façon plus persistante et prononcée pour le modèle de combinaison chirurgicale CCLT-DMM et le modèle MIA. Le modèle MIA a montré des altérations fonctionnelles de la patte controlatérale (patte arrière gauche) pour les deux évaluations fonctionnelles avec une augmentation du report de poids qui était présente et conséquemment, augmentant le seuil de retrait lors de l'évaluation de l'allodynie tactile secondaire aux deux premiers temps d'évaluation. Les neuropeptides spinaux ont été quantifiables dans les moelles épinières pour les groupes chirurgicaux et ces changements ont été liés à de la douleur non physiologique. Un intérêt de l'utilisation du modèle chirurgical a été démontré en comparaison avec le modèle MIA et plus particulièrement, pour le modèle de la combinaison CCLT-DMM, démontrant des



changements plus persistants et progressifs, ce qui pourrait représenter mieux la douleur arthrosique post-traumatique.

### **3.2.6.1 Le modèle chirurgical d'induction de douleur arthrosique a induit des changements neurophysiologiques quantifiables associés à la sensibilisation centrale**

Nos résultats suggèrent que le modèle MIA provoque des changements temporaires des évaluations fonctionnelles de courte durée (retour à des valeurs de base entre jour 14 et jour 21 suite à son injection IA, si on se fie à la distribution pondérale statique et à l'allodynie tactile) et ce modèle repose sur un mécanisme de développement de la maladie différent de l'arthrose naturelle, ce qui limite la prévisibilité des effets thérapeutiques analgésiques et des agents pouvant modifier la maladie. Le test sensoriel quantitatif de la patte lésée a permis de détecter la présence et le développement d'allodynie secondaire jusqu'au dernier point du temps d'évaluation pour le groupe chirurgical par combinaison CCLT-DMM et seulement jusqu'à 14 jours pour le groupe MIA. Cela est une indication probable de la capacité du modèle chirurgical par combinaison CCLT-DMM à induire une allodynie tactile plus persistante par rapport aux autres modèles de cette étude. Comme la stimulation n'est pas au site de la lésion du genou, l'apparition d'une perception de la douleur ailleurs (en dessous de la patte) fait référence à de l'allodynie secondaire, reflétant une hyperexcitabilité centrale (Kuner 2010; Latremoliere et al., 2009; Price et al., 1977). Les modèles chirurgicaux ont aussi engendré le développement d'asymétrie de la charge pondérale statique noté par une diminution du % BW de la patte ipsilatérale, conséquence d'altérations biomécaniques et d'un état douloureux suite à la réticence du rat à appuyer sa patte au sol. Ces modifications des altérations fonctionnelles ont été concomitantes avec la libération de neuropeptides spinaux quantifiés par neuroprotéomique pour les trois groupes chirurgicaux.

Les concentrations des quatre neuropeptides spinaux (SP, CGRP, BK, SST) étant plus élevées dans la moelle épinière à la fin de l'étude, ceci suggère que la douleur dans les modèles chirurgicaux est liée au développement et au maintien d'une hypersensibilisation importante comme le modèle MIA malgré le fait que le suivi temporel de ce dernier ait terminé plus tôt. Il est bien établi, particulièrement pour la SP et le CGRP, qu'en tant que neuromodulateurs, ces neuropeptides sont des médiateurs clés importants de la sensibilisation périphérique et centrale dans l'arthrite inflammatoire et l'arthrose, tout comme nous l'avons déjà précédemment



amplement démontré (Publications 2.1 à 2.5) (Schaible et al., 2009). La BK est bien reconnue pour son implication dans la sensibilisation périphérique (hyperalgésie) comme un médiateur inflammatoire de par son action synergique avec les autres substances qui composent la soupe inflammatoire aux sites de lésion et d'inflammation contribuant à la sensibilisation périphérique et à la potentialisation des effets pro-inflammatoires des cytokines (Meini et al., 2008) de concert avec une vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire. Au niveau de la moelle épinière, la BK est un modulateur de l'excitabilité neuronale *via* la potentialisation de la transmission synaptique glutaminergique pré et postsynaptique, participant à l'hypersensibilité douloureuse (Wang et al., 2005). Chez des patients atteints d'arthrose, une administration d'antagonistes du récepteur de la BK a provoqué des effets analgésiques, supportant un rôle de la BK dans la douleur inflammatoire neurogène (Meini et al., 2008). La SST a un rôle anti-nociceptif bien établi par une diminution de l'excitabilité neuronale (Gaumann et al., 1988) et sa libération est augmentée dans la moelle épinière suite à une stimulation neuronale périphérique (Morton et al., 1988).

Les résultats de l'augmentation de l'expression de la régulation de ces quatre neuropeptides spinaux suite à une induction de la douleur arthrosique avec les modèles chirurgicaux de cette étude confirment leurs implications dans les phénomènes douloureux. En effet, il ne fait plus de doute maintenant que oui, les modèles chirurgicaux peuvent induire de la sensibilisation douloureuse centralisée liée à l'induction de l'arthrose et que les méthodes d'évaluation fonctionnelle et neuroprotéomique sont des méthodes valides, fiables et sensibles afin de détecter tous ces changements neurophysiologiques.

### **3.2.6.2 Le modèle chirurgical de la combinaison CCLT-DMM est le modèle chirurgical le plus sévère et le plus fiable pour l'induction de douleur chronique liée à l'arthrose**

Cette étude pilote a révélé un intérêt limité pour les modèles CCLT et DMM, car leurs modifications fonctionnelles étaient de courte durée et le changement des concentrations des neuropeptides spinaux était non significatif et les changements fonctionnels pas si différents en comparaison avec le groupe Sham. Cela suggère que leurs altérations fonctionnelles sont très probablement le résultat d'une inflammation articulaire associée à l'arthrotomie et non la conséquence d'une instabilité biomécanique importante. Selon la littérature, les modèles CCLT et DMM auraient pu montrer plus d'altérations suite à de l'instabilité biomécanique si les rats

avaient été plus mobiles et plus actifs comme il a été démontré auparavant (Appleton et al., 2007), mais ce n'était pas le but de cette étude. L'effet de groupe pour l'évaluation de l'allodynie tactile de la patte ipsilatérale a montré que la sensibilisation au modèle de la combinaison CCLT-DMM était plus sévère que dans le modèle DMM, car elle a induit plus d'allodynie tactile. Par contre, on se serait attendu à ce que le modèle de la combinaison soit également plus sévère que le modèle CCLT bien que la différence n'ait pas été statistiquement significative dans cette étude, probablement en raison d'une erreur statistique de type II. La même explication s'applique pour l'absence de différence statistique entre les groupes chirurgicaux pour la distribution de la charge pondérale. Tout comme dans le modèle MIA, la méthode de l'évaluation de la sensibilité mécanique tactile s'est avérée une mesure valide, fiable et sensible afin de détecter la sensibilisation centrale dans le modèle chirurgical de la combinaison.

Pour les neuropeptides spinaux, parmi les trois modèles chirurgicaux, le modèle de la combinaison CCLT-DMM a induit une augmentation de la concentration spinale plus importante du CGRP comparativement aux deux autres modèles chirurgicaux, mais aucune différence entre les concentrations de BK et SP n'a été notée entre ces 3 groupes. Compte tenu du fait que l'inflammation est omniprésente dans l'arthrose en périphérie, celle-ci est un donc un joueur majeur dans le développement de la douleur pathologique et conséquemment, il est bien attendu que plus importante sera l'inflammation en périphérie, plus grande sera la sensibilisation centrale. En effet, chez des patients souffrants d'arthrose, le CGRP est un médiateur important de la douleur et de l'inflammation périphérique (Takano et al., 2017), liant ainsi le CGRP à la sensibilisation centrale (Yu et al., 1994) et la neuroplasticité. Une augmentation de la régulation de SST plus élevée a été observée pour le groupe chirurgical de la combinaison CCLT-DMM en comparaison avec le groupe CCLT et Sham, confirmant que le modèle de la combinaison CCLT-DMM est plus douloureux compte tenu d'une plus grande implication de l'activation ou du recrutement des CIDNs afin de contrecarrer un plus haut degré de douleur dans ce modèle. Une telle libération de la SST dans la moelle épinière est associée à une inhibition nociceptive descendante plus accrue (Bar et al., 2004; Pinter et al., 2006). Malgré le rôle connu de la BK dans la douleur chronique liée à l'arthrose (Tenti et al., 2016) tout comme la SP (Grassel et al., 2017), ces deux neuropeptides pronociceptifs n'ont pas montré de différence entre les trois groupes chirurgicaux malgré une augmentation de leur régulation spinale confirmant l'induction de douleur chronique. Cette absence de différence semble être

attribuable aux échantillons de petite taille de cette étude pilote, limitant ainsi la puissance statistique. Les altérations fonctionnelles plus persistantes pour le modèle de la combinaison notamment pour l'allodynie tactile concomitante avec une libération plus élevée de CGRP et de SST quantifiée par neuroprotéomique comparativement aux deux autres modèles confirment que ce modèle mixte induit plus de douleur chronique arthrosique.

### **3.2.6.3 Comparaison des modèles chirurgicaux avec le MIA**

Les changements précoces plus agressifs chez les rats du modèle MIA pour les évaluations fonctionnelles de la douleur comparativement aux modèles chirurgicaux sont attribuables aux effets bien connus de la phase inflammatoire précoce sévère du MIA associée à une douleur importante entre les jours trois et sept, comme observée dans nos travaux antérieurs. Par contre, le modèle chirurgical de la combinaison CCLT-DMM a démontré le maintien du développement de l'allodynie tactile secondaire jusqu'au dernier jour d'évaluation contrairement au retour à des valeurs de base pour le modèle MIA après le jour 14 supportant un niveau plus important de sensibilisation centrale pour le modèle chirurgical. Les altérations biomécaniques des modèles chirurgicaux étaient comparables avec le modèle MIA, mais cette méthode a manqué de sensibilité afin de détecter des différences entre les groupes attribuables à un manque de puissance statistique comme indiqué auparavant. Les concentrations plus élevées des neuropeptides CGRP, SST et BK pour le modèle MIA suggèrent un état de douleur plus élevée pour le MIA, mais aucune différence pour la SP. Cette différence semble néanmoins être attribuable au moment des sacrifices des rats (jour 21 et 42 pour MIA et modèles chirurgicaux, respectivement) donc un effet temporel. En effet, afin de développer des lésions articulaires significatives accompagnées d'une plasticité neuronale dans des modèles expérimentaux (Orita et al., 2011), beaucoup de temps est nécessaire et pour les modèles chirurgicaux, au moins six semaines semblent être requises (Hayami et al., 2006). Il semble donc que pour notre modèle chirurgical de combinaison, le potentiel d'induction de la douleur pathologique n'a pas été atteint (Ferland et al., 2011).

La plus grande différence avec le modèle MIA se situe au niveau des altérations fonctionnelles, mais de la patte controlatérale. En effet, le seuil de retrait pour l'évaluation de l'allodynie tactile a été augmenté entre les jours trois et sept, tout comme le report de poids avec un % BW plus élevée. Ce phénomène n'a pas été observé dans les modèles chirurgicaux,

suggérant que les dommages semblent être plus progressifs dans ce modèle puisqu'il ne produit pas une douleur aussi intense et précoce. Ceci semble être attribuable aux effets inflammatoires précoces du modèle MIA et induisant un état douloureux important et par le fait même, amenant le rat à contrebalancer cet effet en augmentant le poids qui est appuyé sur la patte controlatérale et conséquemment, augmentant ainsi le seuil des valeurs de retrait pour l'évaluation tactile de l'allodynie par stimulation mécanique. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène est aussi potentiellement un recrutement plus important des CIDNs pendant cette période induisant ainsi une analgésie endogène. La présence d'inflammation sévère a le potentiel d'activer les CIDNs, mais leur effet pourrait devenir moins important lorsque l'inflammation diminue (Beaulieu 2005; Felson 2005; Le Bars et al., 1979a). Les niveaux plus élevés de SST pour le modèle MIA supportent cette hypothèse d'activation plus importante des CIDNs puisque plus de neuropeptides anti-nociceptifs (SST) sont requis.

#### **3.2.6.4 Raisonement et pertinence de la réalisation d'une étude pilote exploratoire et ses statistiques**

Les études pilotes jouent un rôle pivot dans la planification lors de recherches d'envergure et souvent coûteuses. Le but fondamental de la réalisation d'une étude pilote est d'examiner la faisabilité d'une approche (méthode et procédure) à petite échelle qui est destinée à être utilisée par la suite, dans une étude à plus grande échelle. Ceci s'applique à tous les types de recherche. En effet, le but de notre étude pilote exploratoire était de générer des données préliminaires quant à la méthode optimale d'induction d'arthrose susceptibles d'inciter par la suite une étude complète reflétant le plus étroitement possible la douleur chronique reliée à l'arthrose chez le rat. Suite à cette étude pilote, nous avons déterminé qu'il serait non éthique notamment dû à une source de temps, d'énergie, mais surtout d'une perte de ressources animales inutiles afin d'explorer davantage les modèles DMM et CCLT chez le rat, alors qu'ils ont été utilisés comme modèles d'arthrose valides chez la souris. De plus, les changements observés avec le modèle MIA nous indiquent qu'ils sont trop transitoires et nuisent à l'évaluation analgésique adéquate d'un composé à l'essai. La publication de cette étude pilote met en évidence la pertinence de poursuivre notre travail sur le modèle de la combinaison CCLT-DMM afin de terminer éventuellement sa validation complète.

Pour cette étude, le raisonnement statistique n'était pas derrière le choix de mener une étude pilote. La raison était plutôt d'un ordre éthique. Pour suivre les règles des 3Rs (Prescott et al., 2017), nous avons limité la taille de l'échantillon de cette étude pilote à 6 individus, afin de respecter également l'exigence minimale suggérée pour la taille d'un échantillon d'un schéma expérimental ( $n = 5$ ) lors d'une étude en pharmacologie (Curtis et al., 2015). Il est reconnu que les petits échantillons (couramment utilisés dans le développement en pharmacologie) sont souvent imprécis, de sorte qu'une différence entre les échantillons peut être dissimulée (Drummond et al., 2011). Par conséquent, l'utilisation de statistiques est nécessaire pour juger des différences (présentes ou absentes) rencontrées, et omettre le résultat des statistiques pour se concentrer uniquement sur son évaluation des graphiques pour émettre son jugement sur l'absence de différence n'est pas optimale d'où notre choix et la pertinence d'avoir utilisé des tests statistiques pour cette étude pilote, malgré le but exploratoire de cette dernière. Cependant, comme il l'est indiqué classiquement (Altman et al., 1995), « l'absence de preuve n'est pas une preuve d'absence ». Nous croyons qu'il est toujours primordial de garder cette phrase à l'esprit peu importe le type de projet de recherche et pour cette raison, nous éditons et suivons toujours une méthodologie statistique rigoureuse pour soutenir notre analyse ainsi que l'interprétation de nos données. D'une autre part, une mauvaise interprétation et l'abus des tests statistiques ont été décriés pendant des décennies et cela a même pu conduire à une proposition d'interdire tous les tests statistiques (Greenland et al., 2016), mais cette position radicale conduirait à une situation très délicate dans le développement pharmacologique.

Pour toute ces raisons, nous adoptons toujours une méthodologie statistique rigoureuse et solide : le dragage de données, la recherche de signification statistique, l'inférence sélective ou le "*P-hacking*", *etc.* (Motulsky 2015) sont des conduites scientifiques et leurs utilisations peuvent conduire à un excès de résultats statistiquement significatifs dans la littérature publiée (Wasserstein et al., 2016) et devraient être résolument évitées et c'est ce que nous faisons toujours dans nos analyses. Notre plan d'étude expérimental était basé sur un calcul d'analyse de la puissance *a priori*, randomisé et en aveugle, les données n'étaient ni normalisées ni transformées sans justification, la normalité et l'homogénéité de variance étaient vérifiées, la « pseudo-réplication » (un échantillon testé en triplicata était  $n = 1$  et non pas  $n = 3$ ) était interdite, notre seuil de signification a été déterminé *a priori*, les analyses étaient bilatérales (Ludbrook 2013; Murphy 2018), et l'analyse *post-hoc* a été complétée selon des règles spécifiques. En effet,

nous avons strictement suivi les récentes recommandations (Curtis et al., 2015) pour la conception et l'analyse expérimentale ainsi que leurs rapports. En dernier lieu, il faut aussi clarifier le fait que nous n'avons pas utilisé un seuil  $P = 0.1$  pour cette étude pilote, ce qui peut porter à confusion. Avec une estimation *a priori* de la puissance d'analyse (bêta), l'évaluation dans le temps a été réalisée pour chaque modèle testé avec un seuil de signification (alpha) de 5 %. Comme la puissance d'analyse *a priori* des différences entre les groupes était faible, il était justifié ici d'utiliser un seuil alpha plus élevé, c'est-à-dire 10 %. Et comme indiqué dans la section 2.6.4.6 de la publication 2.6, nous avons fourni une justification pour ce choix, comme le soutient pleinement la littérature (Zar 2009; Sauro et al., 2016). Classiquement, un seuil statistique  $\alpha < 0.05$  est utilisé pour définir le niveau de signification, mais il peut y avoir des circonstances où un seuil  $\alpha < 0.1$  ou  $< 0.01$  sont plus appropriés. Pour la recherche appliquée, il faut toujours équilibrer le plus équitablement possible la priorité accordée aux erreurs de type I et de type II.

En suivant une telle démarche statistique scientifique stricte et précise, le signal était clair, le modèle de la combinaison CCLT-DMM est différent de Sham, DMM ou CCLT. De plus, les altérations fonctionnelles induites par la combinaison CCLT-DMM sont restées plus longtemps qu'avec le modèle MIA. Pour ce dernier, l'inconfort généré était plus important et de courte durée. De plus, les changements induits par le CCLT et le DMM seuls, en particulier sur les neuropeptides, étaient inexistantes. La validation du modèle de la combinaison CCLT-DMM reste à être validée, voir section 3.2.6.6 pour les perspectives.

### **3.2.6.5 Comparaison entre les modèles étudiés *versus* la maladie naturelle chez l'homme et les autres espèces**

Malgré qu'il n'existe pas encore une espèce animale meilleure qu'une autre pour l'étude de la douleur chronique liée à l'arthrose, l'utilisation de plusieurs organismes procure des avantages distincts dans leur contribution respective à la compréhension des mécanismes sous-jacents tant au niveau de la pathologie que de la douleur qui lui est liée. Ceci permet l'intégration d'une large gamme de connaissance de type moléculaire, génétique, cellulaire et comportementale dans des processus normaux ou pathologiques de la douleur. D'une autre part, dans la pathologie de l'arthrose chez l'humain et d'autres espèces, cette maladie est complexe et variable, ce qui complexifie son traitement (Drihan et al., 2010). Elle intègre plusieurs

sphères, telle que des composantes de la douleur périphérique et centrale combinées à des atteintes des tissus articulaires, supportant la difficulté translationnelle de l'entière de cette maladie avec des modèles animaux la mimant (Eitner et al., 2017). Il faut donc être en mesure d'étudier ses composantes de façon individuelle plutôt que la globalité de ce syndrome avec des modèles animaux. Les modèles animaux les plus couramment utilisés pour étudier la douleur arthrosique sont distincts de ceux employés pour étudier la physiopathologie et les éléments déclencheurs ou les facteurs de risque des dommages structuraux articulaires (Little et al., 2012). Par contre, le niveau d'atteinte des lésions articulaires n'est pas toujours relié à l'intensité de l'expérience douloureuse pour l'humain souffrant d'arthrose (Hannan et al., 2000).

Malgré que les molécules impliquées chez l'humain dans les mécanismes de signalisation et les phénomènes physiologiques liés à la douleur aient un équivalent chez les rongeurs, cela ne semble pas suffisant pour assurer la translation entre les espèces (Mogil et al., 2010). En effet, selon nos observations, le modèle MIA a montré une atteinte aiguë à J+7 puis temporaire jusqu'à J+14 pour revenir à des valeurs normales des mesures de la douleur à J+21. En comparaison avec la pathologie clinique humaine qui peut prendre plusieurs mois, voire des années à se développer, le MIA cause une douleur rapide similaire à l'arthrose en moins d'une semaine. Le développement rapide du modèle MIA est clairement différent du développement lent de l'arthrose humaine, et il affiche des différences substantielles dans la régulation génique (Barve et al., 2007) avec un chevauchement total des gènes modulés dans le même sens entre le modèle MIA chez le rat et la pathologie de l'arthrose chez l'humain inférieur à 4 %. Malgré que ce modèle soit surreprésenté dans les études sur la douleur arthrosique et ne suit pas la progression temporelle naturelle de la pathologie chez l'homme (Marker et al., 2012), il est utile pour étudier les mécanismes de la douleur, car il génère une hyperalgésie mécanique de longue durée (Liu et al., 2011) tel qu'il est également démontré dans ce manuscrit. Par contre, cette apparition de la douleur inflammatoire neurogène rapide avec le MIA permet un criblage plus efficace des cibles thérapeutiques analgésiques potentielles comme nous l'avons démontré, ce qui est une raison principale de la popularité de cet agent chimique.

Quant aux modèles chirurgicaux, ils prennent en moyenne 4 à 8 semaines pour développer un phénotype de douleur et ainsi imiter la progression post-traumatique de la pathologie humaine plus étroitement (Ruan et al., 2013). Les modèles induits par la chirurgie simulent de près le syndrome clinique post-traumatique de l'arthrose dans lequel une



transsection du ligament croisé crânial (antérieur pour l'humain bipède) (modèle de Pond-Nuki) (Pond et al., 1973) ou une déchirure du ménisque médial (Patchornik et al., 2012) ou la combinaison de ces 2 interventions chirurgicales (Kim et al., 2016) peuvent provoquer une déstabilisation du genou, altérant le support de charge et conséquemment, engendrant le développement d'une douleur analogue à celle de l'arthrose (Patchornik et al., 2012; Pond et al., 1973). En effet, dans le modèle MIA (Orita et al., 2011; Sagar et al., 2011) et le modèle DMM (Tran et al., 2017) la microglie est activée, dans le modèle MIA en quelques jours et dans le modèle DMM après environ 8 semaines, reflétant ainsi l'évolution dans le temps de l'arthrose et le développement de la douleur. L'activation de la microglie est un processus qui se produit autant dans des conditions inflammatoires ainsi que dans des conditions neuropathiques (Clark et al., 2007).

En effet, c'est ce qui a été observé avec le modèle de la combinaison CCLT-DMM qui a été plus lent (suivi sur 8 semaines dans nos études comparativement à 3 semaines pour le MIA) à développer des changements avec des lésions moins sévères au début. Par contre, les atteintes étaient plus persistantes et progressives avec le modèle de la combinaison CCLT-DMM démontrant clairement l'installation d'un processus nociceptif pathologique supportant davantage une sensibilisation centralisée de la douleur comme l'arthrose humaine et permettant ainsi l'étude et l'évaluation à plus long terme de composés analgésiques ou modifiants la maladie. Les caractéristiques du modèle de la combinaison CCLT-DMM peuvent donc améliorer la translation du modèle (Eitner et al., 2017). Les modèles chirurgicaux CCLT et DMM n'ont pas été différents du groupe Sham sur les différentes variables testées (évaluation fonctionnelle et neuropeptides spinaux) limitant la pertinence de leurs utilisations chez le rat contrairement à ce qui a été démontré pour la souris (Lorenz et al., 2014). D'un autre côté, notre modèle canin CCLT a montré des différences dans les niveaux d'inflammations et de dommages articulaires entre J+28 et J+42 tout comme des similitudes ont été rapportées entre la pathologie humaine et le modèle d'arthrose post-traumatique du chien (Little et al., 2013). La sensibilisation centrale a été aussi notée et mesurée sur une période de 8 semaines dans le modèle canin CCLT. Par contre, la manipulation des chiens étant plus difficile, longue et ardue, l'hébergement plus complexe et nécessitant des installations spécifiques et conséquemment, augmentant les frais liés à l'utilisation de cette espèce animale et nous contraignent à utiliser des plus petits échantillons diminuant ainsi la puissance statistique des analyses. Par ailleurs, il



ne fait pas de doute que suite à des études plus complètes pour la validation et la caractérisation du modèle de la combinaison CCLT-DMM chez le rat, ce dernier comporte un potentiel réel pour l'étude de la douleur et sa composante structurelle (Eitner et al., 2017). L'évaluation histologique des articulations atteintes permettrait aussi de mieux caractériser les lésions dans le but de non seulement comparer avec les modèles disponibles, mais aussi avec les lésions caractéristiques de la maladie humaine.

Dans le domaine vétérinaire, l'arthrose spontanée de type naturel est aussi représentée comme modèle animal autre que l'arthrose post-traumatique. Elle se développe naturellement suite au vieillissement chez le singe (Carlson et al., 1994) ou dès l'âge de 3 mois pour le cochon d'inde (Jimenez et al., 2007). On la retrouve aussi chez le cheval, où elle est utile pour étudier l'efficacité des thérapies utilisant les cellules-souches (Joswig et al., 2017). Le chat (Guillot et al., 2014; Klinck et al., 2015; Monteiro et al., 2016) et le chien développe aussi de l'arthrose naturelle associée à la sensibilisation centrale (Gordon et al., 2003). L'arthrose naturelle du chat ressemble beaucoup à celle de l'humain (Ryan et al., 2013). Des traitements qui se sont avérés efficaces pour l'arthrose d'animaux de compagnie telle que le chat et le chien, ont montré des effets positifs pour l'arthrose humaine, supportant ces espèces animales comme de meilleurs modèles puisqu'ils partagent le même environnement complexe et changeant que leurs propriétaires (Klinck et al., 2017; Lascelles et al., 2017). Au niveau murin, les souris transgéniques STR/ort développent de l'arthrose naturelle (Kyostio-Moore et al., 2011) et ce modèle a permis de montrer une corrélation entre l'arthrose et la déficience du métabolisme des chondrocytes ou l'altération du taux d'apoptose (Jaeger et al., 2008). Tous ces modèles représentent des opportunités d'étudier le développement et la progression temporelle naturelle de la maladie et de tirer des conclusions pertinentes pour l'espèce humaine ou même d'autres espèces animales. Un inconvénient de l'utilisation des modèles d'arthrose spontanée est l'incidence plus faible de la condition et la progression des lésions sur une période plus variable comparativement aux modèles induits. En conséquence, un plus grand nombre d'animaux doit être utilisé afin d'assurer une puissance statistique adéquate. Ceci, additionné à la progression variable des lésions et au moment non défini du début de la maladie, augmente considérablement les coûts liés aux études (Innes et al., 2010) et aucune standardisation dans les processus de recrutement n'est actuellement disponible. Finalement, aucun des modèles expérimentaux animaux n'est parfait et un des défis majeurs reste à augmenter la valeur translationnelle inter-

espèce est de savoir si les mécanismes douloureux et leurs contrôles pharmacologiques sont semblables dans tous les modèles d'arthrose chronique, ou si une évolution différente des altérations structurelles de l'arthrose hâtive et progressive induit des mécanismes de douleur spécifiques, supportant l'utilisation d'un ou plusieurs modèles animaux.

### **3.2.6.6 Conclusion sur les modèles chirurgicaux, limitations et perspectives**

Compte tenu de l'objectif de développer un modèle expérimental de douleur chronique liée à l'arthrose, le modèle chirurgical de la combinaison a montré la possibilité d'induire des changements compatibles avec de la douleur pathologique chronique. De plus, la comparaison (voir sections 3.2.6.3 et 3.2.6.5) avec le modèle MIA a montré des modifications plus persistantes et moins agressives. Les changements progressifs observés dans le modèle chirurgical de la combinaison CCLT-DMM montrent donc un degré plus élevé de similarité avec l'arthrose post-traumatique naturelle. En effet, les modifications limitées dans le temps du modèle MIA réduisent drastiquement la fenêtre accessible pour évaluer toute efficacité thérapeutique, mais ce modèle est tout de même intéressant lorsqu'il est question d'un criblage rapide de composés pharmacologiques, de validation de méthodes ou bien afin de comparer différentes espèces animales quant à leur capacité à réguler la douleur. Les changements plus persistants, notamment pour le modèle de la combinaison CCLT-DMM, seraient potentiellement utiles pour l'évaluation des modalités thérapeutiques.

Nos résultats du modèle expérimental murin de douleur chronique arthrosique induite par la chirurgie permettent donc de répondre positivement à certaines problématiques énumérées dès le départ, soit ii), iii) et iv), respectivement : oui, la sensibilisation centrale dans le modèle chirurgical, notamment celui de la combinaison CCLT-DMM, peut être quantifiée, entre autres, par la neuroprotéomique étant une méthode valide et sensible *via* la quantification de neuropeptides tels que la SP, le CGRP, la BK et la SST; oui, le modèle expérimental de douleur animale de la chirurgie mime bien la douleur afin d'élucider les mécanismes sous-jacents puisque ce modèle induit le développement d'inflammation et de douleur neuropathique pouvant être modulé par des agents analgésiques; oui, la neuroprotéomique est une méthode spécifique et sensible afin de caractériser et quantifier la douleur de concert avec les méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur. Les objectifs i) et ii) ont donc été également atteints avec le modèle de la chirurgie chez le rongeur qui nous a permis de : i) caractériser les atteintes

du protéome spinal en fonction du niveau de douleur perçu par l'animal et ii) d'identifier le (les) marqueur (s) potentiellement modulé (s) par l'hypersensibilisation nociceptive dans des modèles expérimentaux de douleur murine. De par cette découverte, les hypothèses de recherches ont donc été confirmées aussi avec le modèle de la chirurgie, c'est-à-dire : i) la réponse à l'hypersensibilisation peut être détectée, élucidée et quantifiée, particulièrement au niveau du protéome spinal et que ii) une gestion adéquate de la douleur atténue l'hypersensibilisation et ses conséquences morbides.

Nous devons maintenant compléter l'évaluation comparative du modèle de la combinaison CCLT-DMM et tester sa réactivité à différents traitements analgésiques, à savoir la morphine, le carprofène et la PGB ainsi qu'avec des groupes naïfs et fictifs, en plus d'ajouter de tester les éléments suivant comme perspectives futures dans la phase de validation :

- Des études prospectives avec un plus grand nombre d'animaux et des durées de suivi différent.
- Test de l'effet du genre (effet de l'estradiol), de l'âge et des souches de rats afin de permettre d'obtenir une meilleure caractérisation du modèle chirurgical par combinaison CCLT-DMM.
- Test de l'effet d'un protocole avec ou sans exercice sur les altérations structurelles et fonctionnelles temporelles.
- Comparaison de l'analyse dynamique de la démarche et de distribution de la charge pondérale statique.
- Compléter l'évaluation comportementale avec des vocalisations et des activités d'enfouissement.
- Compléter les analyses neuropeptidomiques avec des changements épigénomiques.

### **3.3 Les perspectives futures dans le domaine des biomarqueurs de la douleur**

#### **3.3.1 L'avenir de la recherche sur les biomarqueurs de la douleur**

Bien que le développement de marqueurs biologiques pour la douleur chronique ait été un objectif majeur des dernières décennies, ces biomarqueurs n'ont pas encore fait leur

chemin dans la pratique clinique. Il y a deux défis principaux à relever : développer des mesures objectives qui capturent la subjectivité de l'expérience de la douleur, et fournir des interventions basées sur la technologie qui offrent de nouvelles approches pour la gestion de la douleur. Cependant, compte tenu des utilisations potentielles des biomarqueurs dans de multiples aspects, tels que l'évaluation de la douleur et de ses facteurs de risque, du diagnostic, du pronostic, de la sélection du traitement, de la découverte de médicaments, et plus encore, les efforts pour découvrir de nouveaux biomarqueurs de la douleur ont été en expansion (Borsook et al., 2011b; Borsook et al., 2011b; Wager et al., 2013).

Parmi ceux-ci, on note beaucoup de progrès récents en neuroimagerie humaine, y compris l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et structurale afin de se rapprocher de l'objectif de développement de marqueurs objectifs, basés sur le cerveau, ses fonctions neuronales et la neuropathologie sous-jacente à la douleur chronique afin d'élaborer la signature cérébrale de la maladie causant la douleur chronique (Woo et al., 2015). Il est bien connu que les régions activées pendant la douleur nociceptive aiguë diffèrent de celles activées lors d'une douleur chronique (Schweinhardt et al., 2006), et ces mêmes zones de douleur sont activées différemment suite à des stimuli nociceptifs chez des patients sains en comparaison avec des patients souffrants de douleur chronique (Baliki et al., 2011). Il existe également des différences documentées entre une douleur de type spontanée et évoquée (Parks et al., 2011). Les signaux d'imagerie en réponse à une douleur individuelle pourraient devenir utiles afin de lier le phénotype de la douleur au génotype de cette dernière (Tracey 2011). Ces mesures d'imagerie du cerveau sont particulièrement prometteuses en tant que biomarqueurs de la douleur chronique, telle que la douleur chronique pelvienne (Bagarinao et al., 2014) ou la douleur chronique lombo-sacrée (Callan et al., 2014). En particulier, les mesures de neuroimagerie structurale pourraient fournir des marqueurs plus stables de neuropathologie de la douleur chronique. Cette technique a permis de discriminer, entre autres, dans le syndrome du côlon irritable de douleur chronique viscérale des patients atteints de patients contrôles avec une précision de plus de 70 % (Labus et al., 2015). Suite à une stimulation électrique périphérique, il a été remarqué aussi que des zones du cerveau sont activées différemment chez des gens souffrants d'arthrose du genou en comparaison avec des personnes saines, supportant des mécanismes de contrôle de la douleur différents ou altérés chez les patients atteints (Hiramatsu et al., 2014). Ce type d'imagerie a également permis de distinguer des chats atteints d'arthrose

naturelle de chat sain permettant d'associer cette pathologie à des apports nociceptifs soutenus et à une activité accrue des voies modulatrices descendantes (Guillot et al., 2015). Par contre, la neuroimagerie est difficile à analyser, longue et coûteuse et requiert une expertise spécifique, limitant son utilisation (Rosa et al., 2014).

Il a également été possible de quantifier *in vivo* le taux d'occupation des récepteurs du CGRP dans le cerveau du singe et de l'humain par tomographie par émission de positrons en utilisant le traceur [11C] MK-4232 (antagoniste R-CGRP radiomarqué) dans la douleur chronique liée à la migraine (Paone et al., 2007; Hostetler et al., 2013). Suite à une administration intraveineuse d'antagonistes puissants et sélectifs des récepteurs CGRP (Telcagepant), ces études ont permis de valider la capacité du traceur [11C] MK-4232 à détecter des changements dans l'occupation des récepteurs CGRP dans le cerveau en fonction de la proportion de la concentration plasmatique du médicament des images obtenues, indiquant le taux d'occupation de ces récepteurs. Cette technique a permis, entre autres, une meilleure gestion des doses nécessaires pour ce médicament. Cette méthode de radiomarquage et de quantification par tomographie par émission de positrons pourrait être appliquée pour la quantification des neuropeptides, cette méthode étant moins invasive et plus accessible que la collecte de LCR pour une application chez l'humain. Par contre, il faudrait être en mesure de développer des traceurs liant les neuropeptides d'intérêt ou bien d'injecter aux patients douloureux des précurseurs synthétiques impliqués dans la cascade de maturation des neuropeptides. Il faudra être en mesure de s'assurer que le composé injecté se lie faiblement aux protéines plasmatiques suite à son injection intraveineuse, passe la barrière hématoencéphalique rapidement et facilement, subisse peu de dégradation par des protéases puis possédant une distribution cohérente dans le SNC.

*In vivo*, sur des animaux anesthésiés, suite à une microdialyse couplée à une analyse LC-MS/MS, il est possible de quantifier des neuropeptides de très faible poids moléculaire sans avoir à développer des produits chimiques de liaison sélective ou de surface (Zestos et al., 2017). Cette technique limite, entre autres, la dégradation des produits à quantifier par les enzymes dans le cas des neuropeptides et reflète des concentrations endogènes plus réalistes. La microdialyse cérébrale a été utilisée pour mesurer des ions, des petites molécules neurotransmetteurs, des métabolites, des hormones, des neuropeptides, des protéines et des drogues, permettant d'étudier la neurochimie sous-jacente à de nombreuses maladies

neurologiques, l'effets des drogues et leurs comportements (Westerink et al., 1982; Carboni et al., 1989; Herrera-Marschitz et al., 1997; Darvesh et al., 2011). Malgré la grande polyvalence de cette technique, elle est difficilement applicable chez l'humain en clinique dans un contexte de mesure de la douleur compte tenu de la méthode plutôt invasive de la microdialyse.

Le dosage du cortisol, l'hormone du stress, aurait pu être aussi envisagé dans nos études chez le rongeur comme potentiel biomarqueur de la douleur. En effet, il a été démontré qu'un hippocampe de petit volume en imagerie par résonance magnétique est associé chez des patients souffrants de douleur chronique lombo-sacrée à un plus haut taux de cortisol dans la salive en comparaison avec des patients contrôles, ce qui semble amener une vulnérabilité accrue à la douleur et augmenterait le risque de développer une chronicité de cette douleur (Vachon-Preseau et al., 2013). Par contre, le dosage seul est peu fiable puisque plusieurs facteurs peuvent perturber les activités de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien et selon le type de douleur chronique, cela peut soit augmenter ou diminuer les taux de cette hormone (McEwen et al., 2010).

Au niveau de la quantification des neuropeptides dans la moelle épinière de nos modèles chez le rongeur, il serait également intéressant de vérifier les concentrations de molécules opioïdes endogènes. Il est bien reconnu que les interneurons et les neurones de la moelle épinière utilisent, en plus du GABA et de la glycine, des molécules opioïdes endogènes comme neurotransmetteurs et neuromodulateurs afin de moduler négativement la transmission et l'amplification de l'information nociceptive (Bowman et al., 2015; Klee et al., 1976). Tous ces peptides opioïdes endogènes sont largement distribués dans les structures cérébrales, principalement celles impliquées dans la nociception et au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Chaturvedi 2003). Ces opioïdes peptides endogènes miment l'action de la morphine en se fixant sur les récepteurs opiacés. Le neuropeptide DYN-A est l'un de ces peptides opioïdes endogènes et il est bien connu qu'il induit un effet inhibiteur *via* les récepteurs opioïdes du SN, entraînant un effet anti-nociceptif après une lésion (Ramos-Colon et al., 2016). De plus, il a été démontré par immunoréactivité que la DYN est co-localisée avec la SP et le CGRP dans les fibres C peptidergiques (Marvizon et al., 2009). Les récepteurs MOR et DOR peuvent être exprimés sur les mêmes neurones que la SP et l'activation de ces récepteurs opioïdes peut interférer avec l'internalisation du rNK1 et par le fait même, diminuer la libération de SP et contribuer à soulager la douleur (Beaudry et al., 2011). En faible concentration, il est

rapporté que la SP stimule la sécrétion de peptides opioïdes endogènes (Zubrzycka et al., 2000). La DYN-A a aussi été rapporté comme pouvant avoir des effets excitatoires des neurones dans la moelle épinière par la liaison aux récepteurs de la BK et causant des effets hyperalgésiques (Lee et al., 2014). Un autre opioïde endogène intéressant est l'endomorphine-2 qui se retrouve principalement aussi dans la moelle épinière et le tronc cérébral inférieur (Martin-Schild et al., 1999). La participation de l'endomorphine-2 dans la modulation et la transmission de la douleur est importante aussi puisqu'elle diminue l'excitabilité des récepteurs postsynaptiques tels que les rNK1 (Fichna et al., 2007) de par son interaction avec les MOR (Wu et al., 2015). La quantification du neuropeptide ENK serait aussi une bonne stratégie pour le dosage neuroprotéomique. Ainsi, l'interneurone enképhalinergique, recrutée par les neurones sérotoninergiques ou noradrénergiques, contiennent des enképhalines comme les dérivés Met-ENK et Leu-ENK, qui agissent sur les récepteurs opiacés, de façon présynaptique, sur l'afférence primaire en limitant la décharge transmise à la cellule de la corne dorsale. L'application de stimulations prolongées et intenses déclenche l'action analgésique des opiacés. Le CIDN produit donc une inhibition descendante qui ne se limite plus seulement à la région stimulée (Dickenson et al., 1981; Talbot et al., 1989) et pouvant donc produire une hypoalgésie globale. La faisabilité de la quantification dans la moelle épinière de ces peptides opioïdes a été validé auparavant chez la souris (Saidi et al., 2015). La pertinence de vérifier éventuellement dans les études futures du laboratoire les concentrations d'opioïdes endogènes est cohérente avec la littérature et permettrait de vérifier l'état des systèmes endogènes des CIDNs et de confirmer d'éventuelles altérations ou non de ces systèmes dans la douleur chronique.

L'épigénétique est un domaine en pleine émergence aussi pour l'étude des mécanismes de la douleur chronique (Lopez-Gonzalez et al., 2017). Un développement important dans cette sphère a été réalisé dans les dernières années quant à l'implication des acides ribonucléiques fonctionnels non codants (ncARNs) comme régulateurs clés post-transcriptionnels et leur possibilité de modifier l'expression d'une multitude d'ARN messenger cibles et de protéines correspondantes. En ce sens, l'étude de microARN (miARNs) dans des conditions de douleur chronique pourrait conduire à une percée dans la gestion de la douleur. Parmi les ncARNs, les miARNs sont les mieux étudiés et sont reconnus comme importants dans diverses facettes du SN, allant du développement normal jusqu'à celui de l'apparition d'une pathologie et le maintien d'un état douloureux, y compris leur implication dans le phénomène de la plasticité



neuronale (Schratt et al., 2006). En conséquence, des modifications dans les profils de miARNs peuvent être utiles comme biomarqueurs potentiels de la douleur. Par exemple, dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat suite à une lésion neuronale, sept miARNs ont été identifiées à partir de DRG et impliqués dans la guérison de la douleur neuropathique tandis que la diminution de quatre d'entre eux était associée au développement de la douleur chronique (Norcini et al., 2014). Dans la même lignée, des modifications dans les profils d'expression des miARN, mais dans le sérum de rats après la ligature du nerf spinal ont été observées par rapport à des rats naïfs (Xu et al., 2014). Ces changements ont été significativement corrélés avec une expression élevée de cytokines inflammatoires et des niveaux de douleur suggérant ainsi que des modifications de miARNs sont impliquées dans la régulation de la douleur neuropathique.

La quantification des miARNs sanguins serait une méthode beaucoup plus envisageable pour des applications cliniques et une méthode moins invasive que de quantifier des neuropeptides spinaux dans le LCR comme biomarqueur de la douleur. Dans la maladie de l'arthrose, il a été démontré que de nombreux miARNs différents sont exprimés dans les chondrocytes (Yu et al., 2011) ou le liquide synovial (Li et al., 2016), et chaque miARN peut réguler des centaines de gènes cibles, créant un réseau complexe de régulation des gènes. Comme perspective future, il serait intéressant de tester ces résultats dans des environnements plus uniformes et physiologiques avec des modèles animaux de douleur chronique arthrosique, ce qui pourrait éventuellement permettre de clarifier les rôles individuels des miARNs et de leurs cibles et ainsi servir de base solide pour la translation de ces résultats chez des patients souffrant de douleur chronique liée à l'arthrose et, par la suite, comprendre davantage le phénomène de la sensibilisation centrale.

Il serait également intéressant de pouvoir développer un système de biocapteur pour la quantification *in vivo* des neuropeptides suite à la liaison de ce peptide avec son récepteur. Un biocapteur est un dispositif analytique utilisé pour la détection sélective de l'analyte dans des échantillons *in vitro* ou *in vivo*, pour ensuite transformer l'interaction formée en un signal mesurable (Thakur et al., 2013). Les biocapteurs (d'affinité, catalytique ou métabolique) sont groupés selon le type de l'élément (enzyme, anticorps, micro-organisme, tissu biologique ou organelle) et de la nature du transducteur (électrochimique, optique, acoustique, calorimétrique) biologiques qu'ils contiennent. Présentement, dans l'industrie de l'alimentation, le développement de biocapteur optique utilisant la nanotechnologie comme outil de détection



rapide de contaminants chimiques externes ou de micro-organismes dans la nourriture est une méthode très populaire tout étant très spécifique et sensible (Lan et al., 2017). Récemment, *in vitro*, il a été possible de quantifier le VEGF par transfert d'énergie par résonance de bioluminescence basé sur une seule molécule biocaptatrice avec des possibilités d'applications *in vivo* (Wimmer et al., 2016).

Effectivement, cette technologie a été utilisée afin de quantifier des interactions protéine-protéine chez des souris vivantes suite à une injection de cellules stables exprimant le domaine de liaison de la protéine pour la rapamycine afin de quantifier cette molécule suite à l'interaction protéine-protéine (Dragulescu-Andrasi et al., 2011). La souris est ensuite soumise à différentes longueurs d'onde et des images de bioluminescence sont créées et comparées à des souris ayant été injectées avec un contrôle négatif afin de quantifier par ratio relatif l'agent pharmacologique. Puisque les neuropeptides se lient à des récepteurs de type GPCR, l'interaction protéine-protéine est donc possible pour la quantification avec ce type de biocapteur. La sélectivité fonctionnelle intracellulaire du récepteur de type 1 de l'angiotensine II avec la sous-unité pGα<sub>q</sub> et la β-arrestine a été étudiée également avec cette méthode de biocapteur utilisant le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (Namkung et al., 2016). L'application de ce type de méthode de quantification permettrait une utilisation moins invasive de la quantification de neuropeptides comme biomarqueur de la douleur dans nos modèles expérimentaux afin de mieux comprendre les mécanismes de la douleur tout comme dans une optique d'application clinique.

Dans la même lignée, l'utilisation de l'optogénétique est une méthode révolutionnaire récemment mise au point afin de traiter la douleur sans intervention thérapeutique pharmacologique et conséquemment, limitant les effets secondaires de ceux-ci. Entre autres, suite à une modification génétique de souris par transfection de virus ou bactéries afin de rendre les neurones du système sensoriel périphérique sensibles à la lumière par une expression des nocicepteurs Nav1.8 + à des protéines appelées opsines, il devient donc possible de les rendre réactives à la lumière (Uhelski et al., 2017). Lorsque les neurones sensoriels sont exposés à une lumière jaune-orange, ces opsines déplacent des ions positifs à travers la membrane, ce qui diminue l'activité bioélectrique des cellules. Concrètement, cela éteint les neurones et atténue la sensibilité de la souris au toucher et à la chaleur sans médicament analgésique. Il a été possible d'activer, dans les fibres C, les nocicepteurs peptidergiques du TRPV1 et non peptidergiques exprimant le récepteur couplé à la protéine G et d'évaluer l'impact sur des

évaluations quantitatives sensorielles suite à des stimulations dermiques par des lumières de couleurs différentes (Beaudry et al., 2017). Il serait donc intéressant, comme dans la pathologie de l'arthrose, d'appliquer cette technologie dans nos modèles expérimentaux puisque la douleur chronique arthrosique est un processus complexe intégrant plusieurs facettes et son traitement est ardu. Ceci permettrait d'élucider des mécanismes spécifiques comme l'implication d'une activation ou d'une inhibition des voies sensorielles excitatrices ou inhibitrices de la douleur tout comme celle des récepteurs spécifiques des neuropeptides.

### **3.3.2 La considération d'un biomarqueur intégrant les systèmes immunitaires, inflammatoires et nerveux**

Les résultats observés quant à un rôle potentiel de la TTR comme biomarqueur de la douleur dans les modèles bovin, canin ainsi que murin tout comme la régulation à la hausse des neuropeptides spinaux tels que la SP, le CGRP, la BK et la SST dans les modèles rongeurs de douleur arthrosique supportent l'importance d'identifier des biomarqueurs valides et fiables. Puisque l'arthrose est la pathologie majoritairement étudiée dans le laboratoire et dans l'optique de toujours être en mesure de quantifier la douleur, nos résultats neuroprotéomiques montrent qu'il devient donc d'un intérêt majeur d'identifier un biomarqueur au cœur des systèmes immunitaires, inflammatoires et nerveux. Outre nos observations de la modulation de la TTR dans nos deux premières études (et les compléments d'analyses dans le modèle murin) lors de douleur chronique, la TTR est aussi impliquée dans les événements inflammatoires et immunitaires (Borish et al., 1992).

Il serait donc intéressant de s'attarder à la quantification du NGF dans les expérimentations futures du laboratoire comportant l'induction de la douleur liée à l'arthrose. En effet, le NGF est surexprimé dans les tissus périphériques afin de lier le TrKA des terminaisons sensorielles des neurones pour se retrouver dans les DRGs par transport antérograde puis activer la voie de signalisation MAPK/Erk (Obata et al., 2004). Les lymphocytes CD4 + du système immunitaire expriment aussi la TrKA afin de synthétiser et libérer le NGF et lui conférer un rôle dans la modulation du réseau des systèmes immunitaires et inflammatoires (Lambiase et al., 1997). L'activation de l'axe NGF-MAPK/Erk augmente la régulation de l'expression de médiateurs de la douleur, incluant le TRPV1, la SP, le CGRP, le BDNF et des canaux ioniques comme Cav3.2, 3.3 et Nav1.8 (McKelvey et al., 2013).

L'activation de la signalisation de la douleur par le NGF est aussi retrouvée dans les mastocytes menant à une libération de médiateurs pro-inflammatoires et nociceptifs, y compris l'histamine et les PGs (Kawamoto et al., 2002) et conséquemment, libérant aussi du NGF (Kawamoto et al., 2002). La signalisation du complexe NGF/TrkA favorise l'angiogénèse et la croissance neuronale. Le processus de l'angiogénèse n'est pas seulement inflammatoire, mais sert aussi de voie pour la croissance neuronale dans l'articulation (Walsh et al., 2010). Compte tenu des effets analgésiques par un traitement anti-NGF pour la douleur associée à l'arthrose, la compréhension des rôles précis de la voie NGF/TrkA est donc d'un grand intérêt (Chen et al., 2017). La quantification de la TTR concomitante avec celle du NGF serait effectivement un choix judicieux à adopter pour les modèles arthrosiques afin d'élucider peut-être un lien entre ces deux marqueurs.

### **3.3.3 Limitations de la quantification d'un biomarqueur**

Les limitations rencontrées dans nos travaux dans le dosage des biomarqueurs ont d'abord été d'un ordre méthodologique. C'est-à-dire, chaque méthode de quantification à ses propres limites quant à sa spécificité, sa valeur seuil de détection des concentrations ainsi que dans l'exécution du protocole ou de la maîtrise de l'utilisation de l'appareil. Une quantification par immunodosage étant beaucoup moins sensible et spécifique qu'un dosage par spectrométrie de masse. Par contre, cette dernière méthode est moins accessible et beaucoup plus coûteuse et demande une bonne expertise afin de pouvoir l'utiliser, limitant son utilisation.

Pour le dosage de la TTR, nous avons été contraints à un manque de disponibilité commerciale de kit d'immunodosage spécifique pour le rongeur. Il aurait été peut-être envisageable de développer un standard interne d'un fragment de la TTR pour un dosage par spectrométrie de masse. Il faut également être cohérent avec le choix du marqueur à doser et du compartiment choisi afin de collecter le fluide ou le tissu biologique. L'utilisation du LCR dans l'étude bovine est une limitation de son utilisation en clinique due à la méthode invasive pour sa collection. La doser dans le sérum (beaucoup de contaminants, donc la purification des échantillons est nécessaire), limite les conclusions de sa modulation avec le phénomène de la sensibilisation centrale. Le LCR contient également beaucoup de sels pouvant interférer avec les méthodes de quantification. Une purification sur colonne d'affinité devient nécessaire aux

dépens d'une dégradation des neuropeptides (donc il faut être prévoyant et utiliser des inhibiteurs de protéases).

Malgré le fait que le prélèvement des composantes du SNC comme le LCR ou la moelle épinière reflète parfaitement les changements dans le protéome spinal, mais ne soit pas facilement accessible ou tout simplement impossible en clinique, ceci limite la transposition de l'utilisation de cette technique. Cependant, en recherche fondamentale, la neuroprotéomique par quantification des neuropeptides spinaux par spectrométrie de masse est un outil en plein essor pour la quantification des protéines, car elle présente un gain en spécificité et en sensibilité (Pan et al., 2009). La spectrométrie de masse est très sensible et peut donc être utilisée pour des molécules de faibles concentrations (attomole) comme il est le cas dans le LCR (Hou et al., 2012).

D'un autre point de vue, l'utilisation de la moelle épinière entière dans nos études peut générer des concentrations de neuropeptides spinaux moins élevées et ne permet pas la distinction entre la quantité emmagasinée dans les vésicules et celle libérée dans la fente synaptique et par le fait même, ne permet pas d'identifier spécifiquement la cible d'une modification de la régulation de l'expression de ces neuropeptides, comme il est le cas en métabolomique entre autres, pour la quantification de petites molécules comme des enzymes responsables de la maturation des protéines ou de métabolites actifs (Fernie et al., 2004). Ce qui est mesuré dans nos études est le résultat final de toutes les modifications en amont donc il nous est impossible d'identifier spécifiquement des cibles potentielles liées à ces modifications. D'un autre côté, les modifications protéiques (sur- ou sous- expression) dans le SNC (LCR, moelle épinière, ganglions rachidiens) étant relativement rapide, la quantification de biomarqueurs neurogènes tels que les neuropeptides, deviennent un indicateur informatif important à un moment précis et selon une condition douloureuse précise de l'activité neuronale qui survient lors de la progression temporelle de la douleur comme il est le cas dans une douleur chronique associée à l'arthrose (Poole et al., 2010).

Par contre, il ne fait pas de doute que le dosage de neuropeptides spinaux dans la moelle épinière lorsque les animaux sont sacrifiés à la fin d'une étude expérimentale, permet la génèse d'une valeur objective pertinente de la douleur afin de valider les tests sensoriels quantitatifs en fonction du niveau de douleur perçu par l'animal. Par contre, tout comme pour le LCR, l'utilisation de la moelle épinière rend impossible la translation de nos résultats vers une

application clinique. Dans le meilleur des mondes, le biomarqueur idéal de la douleur chronique, autant pour les animaux que pour les humains, devrait être facilement accessible, spécifique, sensible et refléter la douleur spinale. L'épigénétique semble être une avenue prometteuse afin d'identifier un marqueur de la douleur respectant ces critères.

## 4. Conclusion générale

Compte tenu de l'importance d'étudier la douleur chronique due à des lacunes dans l'identification et la mise en marché de nouveaux composés analgésiques, les modèles expérimentaux mimant ce phénomène complexe chez les animaux sont d'une importance capitale. L'utilisation d'une approche translationnelle dans nos travaux a été fondamentale afin de bien comprendre les mécanismes de la douleur chronique puisque celle-ci est un phénomène très subjectif chez les animaux.

Nous avons pu démontrer que dans le processus d'élaboration de modèles animaux et de la validation de méthodes d'évaluation fiables, valides et reproductibles mimant la douleur afin d'augmenter la validité de construit du modèle expérimental, plusieurs éléments doivent être pris en considération. En effet, les conditions environnementales (expérimentateur, bien-être animal, enrichissement, acclimatation, etc.), l'espèce animale (bovin, canin, rongeur, etc., et le sexe, le cycle circadien, etc.), le modèle animal (le type d'induction) et le schéma expérimental (groupes de comparaisons, temps d'évaluations, le choix du composé pharmacologique pour une intervention thérapeutique) sont tous des paramètres pouvant influencer les résultats ainsi que l'interprétation des évaluations neurophysiologiques. De plus, nous avons amplement démontré la nécessité de l'identification et de l'utilisation de la neuroprotéomique afin d'identifier un biomarqueur fiable pour quantifier la douleur et les propriétés antalgiques de composés pharmacologiques dans le but d'augmenter la validité associée aux évaluations fonctionnelles des mesures réflexes.

L'atteinte de nos objectifs du départ confirme positivement les problématiques qu'il est effectivement possible d'identifier de nouveaux marqueurs à composante neuropathique afin de quantifier la sensibilisation centrale au niveau spinal. Les modèles animaux miment également bien la douleur afin d'élucider les mécanismes sous-jacents. Finalement, il ne fait plus de doute que l'utilisation de la neuroprotéomique est une méthode spécifique et sensible afin de caractériser et quantifier la douleur de concert avec les méthodes d'évaluation fonctionnelle de la douleur dans le but de permettre une gestion complètement nouvelle de la douleur et du bien-être animal. Le défi réside maintenant dans le développement et l'utilisation d'une méthode d'identification de biomarqueur (s) de la douleur pouvant être aussi applicable en recherche que dans un contexte clinique.

## Bibliographie

- Abaei M, Sagar DR, Stockley EG, et al. (2016) Neural correlates of hyperalgesia in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain. *Mol Pain* 12.
- Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, et al. (2003) Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7947-52.
- Adelson D, Lao L, Zhang G, et al. (2009) Substance P release and neurokinin 1 receptor activation in the rat spinal cord increase with the firing frequency of C-fibers. *Neuroscience* 161: 538-53.
- Afjehi-Sadat L, Brejnikow M, Kang SU, et al. (2010) Differential protein levels and post-translational modifications in spinal cord injury of the rat. *J Proteome Res* 9: 1591-7.
- Ahmed AS, Li J, Ahmed M, et al. (2010) Attenuation of pain and inflammation in adjuvant-induced arthritis by the proteasome inhibitor MG132. *Arthritis Rheum* 62: 2160-9.
- Ahmed AS, Li J, Erlandsson-Harris H, et al. (2012) Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. *Pain* 153: 18-26.
- Ahn DK, Lim EJ, Kim BC, et al. (2009) Compression of the trigeminal ganglion produces prolonged nociceptive behavior in rats. *Eur J Pain* 13: 568-75.
- Akira S and Sato S (2003) Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 35: 555-62.
- Alles SR, Bandet MV, Eppler K, et al. (2017) Acute anti-allodynic action of gabapentin in dorsal horn and primary somatosensory cortex: Correlation of behavioural and physiological data. *Neuropharmacology* 113: 576-90.
- Alshami AM (2014) Knee osteoarthritis related pain: a narrative review of diagnosis and treatment. *Int J Health Sci (Qassim)* 8: 85-104.
- Alshehri B, D'Souza DG, Lee JY, et al. (2015) The diversity of mechanisms influenced by transthyretin in neurobiology: development, disease and endocrine disruption. *J Neuroendocrinol* 27: 303-23.
- Altman DG and Bland JM (1995) Absence of evidence is not evidence of absence. *Brit Med J* 311: 485.

- Alvarez FJ and Priestley JV (1990) Ultrastructure of somatostatin-immunoreactive nerve terminals in laminae I and II of the rat trigeminal subnucleus caudalis. *Neuroscience* 38: 359-71.
- Alvaro-Gracia JM (2004) Licofelone--clinical update on a novel LOX/COX inhibitor for the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 43 Suppl 1: i21-5.
- Amara SG, Arriza JL, Leff SE, et al. (1985) Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229: 1094-7.
- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, et al. (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-4.
- Amin AR, Dave M, Attur M, et al. (2000) COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2: 447-53.
- Amir R and Devor M (1992) Axonal cross-excitation in nerve-end neuromas: comparison of A- and C-fibers. *J Neurophysiol* 68: 1160-6.
- Aow J, Dore K and Malinow R (2015) Conformational signaling required for synaptic plasticity by the NMDA receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 14711-6.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, et al. (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9: 463-84.
- Apkarian AV, Hashmi JA and Baliki MN (2011) Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* 152: S49-64.
- Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, et al. (2007) Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9: R13.
- Authier N, Balayssac D, Marchand F, et al. (2009) Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics* 6: 620-9.
- Baba H, Ji RR, Kohno T, et al. (2003) Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 24: 818-30.
- Baliki MN, Schnitzer TJ, Bauer WR, et al. (2011) Brain morphological signatures for chronic pain. *PLoS One* 6: e26010.



- Bannister K and Dickenson AH (2017) The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *J Physiol*.
- Bannister K, Patel R, Goncalves L, et al. (2015) Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury: restoring an imbalance between descending monoamine inhibitions and facilitations. *Pain* 156: 1803-11.
- Bar KJ, Schurigt U, Scholze A, et al. (2004) The expression and localization of somatostatin receptors in dorsal root ganglion neurons of normal and monoarthritic rats. *Neuroscience* 127: 197-206.
- Bagarinao E, Johnson KA, Martucci KT, et al. (2014) Preliminary structural MRI based brain classification of chronic pelvic pain: A MAPP network study. *Pain* 155: 2502-9.
- Baranauskas G and Nistri A (1998) Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 54: 349-65.
- Barber DL, McGuire ME and Ganz MB (1989) Beta-adrenergic and somatostatin receptors regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem* 264: 21038-42.
- Bargmann W, Lindner E and Andres KH (1967) [On synapses on endocrine epithelial cells and the definition of secretory neurons. Studies on the pars intermedia of the cat hypophysis]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 77: 282-98.
- Baron R, Binder A and Wasner G (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 9: 807-19.
- Barth KS, Guille C, McCauley J, et al. (2017) Targeting practitioners: A review of guidelines, training, and policy in pain management. *Drug Alcohol Depend* 173 Suppl 1: S22-S30.
- Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, et al. (2007) Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis and Cartilage* 15: 1190-1198.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, et al. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139: 267-84.
- Basbaum AI and Fields HL (1978) Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 4: 451-62.
- Battaglia G and Rustioni A (1988) Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 277: 302-12.

- Beaudet A and Descarries L (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* 3: 851-60.
- Beaudry F, Ferland CE and Vachon P (2009) Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 23: 940-50.
- Beaudry F and Vachon P (2006) Determination of substance P in rat spinal cord by high-performance liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 20: 1344-50.
- Beaudry H, Daou I, Ase AR, et al. (2017) Distinct behavioral responses evoked by selective optogenetic stimulation of the major TRPV1+ and MrgD+ subsets of C-fibers. *Pain*.
- Beaudry H, Dubois D and Gendron L (2011) Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. *J Neurosci* 31: 13068-77.
- Beaulieu P (2005) *Pharmacologie de la douleur*. Presses de l'Université de Montréal : Montréal.
- Beaulieu P (2013) *La Douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique*. Presses de l'Université de Montréal : Montréal.
- Beaulieu P and Chauvin M (2005). *Pharmacologie des opioïdes*. Dans: Beaulieu P (2005). *Pharmacologie de la douleur*. Les Presses de l'Université de Montréal : Montréal.
- Becker KL, Nylen ES, White JC, et al. (2004) Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1512-25.
- Bellei E, Vilella A, Monari E, et al. (2017) Serum protein changes in a rat model of chronic pain show a correlation between animal and humans. *Sci Rep* 7: 41723.
- Bennett GJ and Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107.
- Berryman ER, Harris RL, Moalli M, et al. (2009) Digigait quantitation of gait dynamics in rat rheumatoid arthritis model. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 9: 89-98.
- Bert J, Mahowald ML, Frizelle S, et al. (2016) The Effect of Treatment with Resiniferatoxin and Capsaicin on Dynamic Weight Bearing Measures and Evoked Pain Responses in a Chronic Inflammatory Arthritis Murine Model. *Intern Med Rev (Wash D C)* 2016.

- Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, et al. (2010) Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1594-601.
- Besson JM and Chaouch A (1987) Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 67: 67-186.
- Besson JM, Guilbaud G, Abdelmoumene M, et al. (1982) [Physiology of nociception]. *J Physiol (Paris)* 78: 7-107.
- Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44: 1-80.
- Biomarkers Definitions Working G (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89-95.
- Bjorkroth U, Rosell S, Xu JC, et al. (1982) Pharmacological characterization of four related substance P antagonists. *Acta Physiol Scand* 116: 167-73.
- Blake CC, Geisow MJ, Oatley SJ, et al. (1978) Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol* 121: 339-56.
- Bodnar RJ (2017) Endogenous Opiates and Behavior: 2015. *Peptides* 88: 126-88.
- Borish L, King MS, Mascali JJ, et al. (1992) Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation* 16: 471-84.
- Boscato LM and Stuart MC (1986) Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 32: 1491-5.
- Borsook D, Becerra L, Hargreaves R, et al. (2011a) Biomarkers for chronic pain and analgesia. Part 1: the need, reality, challenges, and solutions. *Discov Med* 11: 197-207.
- Borsook D, Becerra L, Hargreaves R, et al. (2011b) Biomarkers for chronic pain and analgesia. Part 2: how, where, and what to look for using functional imaging. *Discov Med* 11: 209-19.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, et al. (2003) Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 821-30.
- Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, et al. (2006) Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1041-8.

- Bowles RD, Mata BA, Bell RD, et al. (2014) In vivo luminescence imaging of NF-kappaB activity and serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 66: 637-46.
- Bowman BR and Goodchild AK (2015) GABA and enkephalin tonically alter sympathetic outflows in the rat spinal cord. *Auton Neurosci* 193: 84-91.
- Boyce-Rustay JM, Zhong C, Kohnken R, et al. (2010) Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology* 58: 537-43.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-9.
- Brill MM and Whiffen JR (1985) Application of 24-hour burst TENS in a back school. *Phys Ther* 65: 1355-7.
- Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, et al. (1980) Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brain Res* 191: 443-57.
- Brown E (2016) Genetics: An incomplete mosaic. *Nature* 535: S12-3.
- Brown MT, Murphy FT, Radin DM, et al. (2012) Tanezumab reduces osteoarthritic knee pain: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *J Pain* 13: 790-8.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, et al. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 1013-21.
- Bullock CM, Wookey P, Bennett A, et al. (2014) Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheumatol* 66: 2188-200.
- Bullock TH (1951) Conduction and transmission of nerve impulses. *Annu Rev Physiol* 13: 261-80.
- Burma NE, Leduc-Pessah H, Fan CY, et al. (2016) Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *J Neurosci Res*.
- Bussieres G, Jacques C, Lainay O, et al. (2008) Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Res Vet Sci* 85: 294-306.
- Butler RK and Finn DP (2009) Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 88: 184-202.

- Callan D, Mills L, Nott C, et al. (2014) A tool for classifying individuals with chronic back pain: using multivariate pattern analysis with functional magnetic resonance imaging data. *PLoS One* 9: e98007.
- Calvino B and Grilo RM (2006) Central pain control. *Joint Bone Spine* 73: 10-6.
- Calvo M and Bennett DL (2012) The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 234: 271-82.
- Calvo M, Dawes JM and Bennett DL (2012) The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol* 11: 629-42.
- Calvo M, Zhu N, Grist J, et al. (2011) Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway. *Glia* 59: 554-68.
- Calvo M, Zhu N, Tsantoulas C, et al. (2010) Neuregulin-ErbB signaling promotes microglial proliferation and chemotaxis contributing to microgliosis and pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 30: 5437-50.
- Carboni E, Imperato A, Perezzi L, et al. (1989) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28: 653-61.
- Carlson CS, Loester R, Jayo MJ, et al. (1994) Osteoarthritis in Cynomolgus Macaques: A Primate Model of Naturally Occurring Disease. *J Orthop Res* 12: 331-339.
- Carter MS and Krause JE (1990) Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci* 10: 2203-14.
- Castel A and Vachon P (2013) Gabapentin reverses central pain sensitization following a collagenase-induced intrathalamic hemorrhage in rats. *J Pain Res* 7: 5-12.
- Castellano C, Puglisi-Allegra S, Renzi P, et al. (1985) Genetic differences in daily rhythms of pain sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 23: 91-2.
- Chang KJ and Cuatrecasas P (1979) Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J Biol Chem* 254: 2610-8.
- Chang MM and Leeman SE (1970) Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem* 245: 4784-90.
- Chang MM, Leeman SE and Niall HD (1971) Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 232: 86-7.

- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53: 55-63.
- Chapman V and Dickenson AH (1992) The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol* 219: 427-33.
- Chaturvedi K (2003) Opioid peptides, opioid receptors and mechanism of down regulation. *Indian J Exp Biol* 41: 5-13.
- Chen D, Shen J, Zhao W, et al. (2017) Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res* 5: 16044.
- Chen G, Park CK, Xie RG, et al. (2014) Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain* 137: 2193-209.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, et al. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44: 8-12.
- Chen Y, Zhang X, Wang C, et al. (2008) Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16773-8.
- Chesler EJ, Ritchie J, Kokayeff A, et al. (2003) Genotype-dependence of gabapentin and pregabalin sensitivity: the pharmacogenetic mediation of analgesia is specific to the type of pain being inhibited. *Pain* 106: 325-35.
- Chiu IM, von Hehn CA and Woolf CJ (2012) Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci* 15: 1063-7.
- Christgau S, Tanko LB, Cloos PA, et al. (2004) Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor modulator (SERM). *Menopause* 11: 508-18.
- Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, et al. (1999) Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* 56: 235-42.
- Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, et al. (2007) Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain* 11: 223-230.
- Clark AK, Gruber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, et al. (2015) Selective activation of microglia facilitates synaptic strength. *J Neurosci* 35: 4552-70.

- Coetzee JF, Lubbers BV, Toerber SE, et al. (2008) Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. *Am J Vet Res* 69: 751-62.
- Cohen LL, La Greca AM, Blount RL, et al. (2008) Introduction to special issue: Evidence-based assessment in pediatric psychology. *J Pediatr Psychol* 33: 911-5.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. (2017) Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17002.
- Combe R, Bramwell S and Field MJ (2004) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett* 370: 236-40.
- Conde J, Scotece M, Gomez R, et al. (2011) Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. *Arthritis* 2011: 203901.
- Conductier G, Blondeau N, Guyon A, et al. (2010) The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol* 224: 93-100.
- Costa GM, de Oliveira AP, Martinelli PM, et al. (2016) Demyelination/remyelination and expression of interleukin-1beta, substance P, nerve growth factor, and glial-derived neurotrophic factor during trigeminal neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 612: 210-8.
- Costigan M, Befort K, Karchewski L, et al. (2002) Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci* 3: 16.
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, et al. (2009) T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci* 29: 14415-22.
- Cottrell GS, Padilla B, Pikios S, et al. (2006) Ubiquitin-dependent down-regulation of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem* 281: 27773-83.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, et al. (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438: 1017-21.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, et al. (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424: 938-42.
- Craft GE, Chen A and Nairn AC (2013) Recent advances in quantitative neuroproteomics. *Methods* 61: 186-218.



- Craig AD (2009) A rat is not a monkey is not a human: comment on Mogil (Nature Rev. Neurosci. 10, 283-294 (2009)). *Nat Rev Neurosci* 10: 466.
- Cunha TM, Verri WA, Jr., Vivancos GG, et al. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 37: 401-7.
- Curtis MJ, Bond RA, Spina D, et al. (2015) Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication BJP. *Brit J Pharmacol* 172: 3461-3471.
- Curtis EG and Patel JA (1978) Enzyme multiplied immunoassay technique: a review. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 9: 303-20.
- Darvesh AS, Carroll RT, Geldenhuys WJ, et al. (2011) In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 6: 109-27.
- D'Mello R and Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101: 8-16.
- D'Mello R, Marchand F, Pezet S, et al. (2011) Perturbing PSD-95 interactions with NR2B-subtype receptors attenuates spinal nociceptive plasticity and neuropathic pain. *Mol Ther* 19: 1780-92.
- De Vries P, Villalon CM and Saxena PR (1999) Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *Eur J Pharmacol* 375: 61-74.
- Decosterd I and Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149-58.
- DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, et al. (2004) Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50: 1207-15.
- Dennis T, Fournier A, Cadieux A, et al. (1990) hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 123-8.
- Deyo RA, Walsh NE, Martin DC, et al. (1990) A controlled trial of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) and exercise for chronic low back pain. *N Engl J Med* 322: 1627-34.
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghurir R, et al. (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 48: 567-92.
- Di Cesare Mannelli L, Micheli L, Crocetti L, et al. (2017) alpha2 Adrenoceptor: a Target for Neuropathic Pain Treatment. *Mini Rev Med Chem* 17: 95-107.



- Dickenson AH, Rivot JP, Chaouch A, et al. (1981) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat with or without pCPA pretreatment. *Brain Res* 216: 313-21.
- Dickson PW, Aldred AR, Marley PD, et al. (1985) High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 890-5.
- Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, et al. (2011) LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res* 90: 759-64.
- Divino CM and Schussler GC (1990) Transthyretin receptors on human astrocytoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1265-8.
- Dixon MJ, Taylor PM, Slingsby L, et al. (2010) A small, silent, low friction, linear actuator for mechanical nociceptive testing in veterinary research. *Lab Anim* 44: 247-53.
- Donnerer J, Schuligoi R and Stein C (1992) Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 49: 693-8.
- Dragulescu-Andrasi A, Chan CT, De A, et al. (2011) Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12060-5.
- Drapeau G, D'Orleans-Juste P, Dion S, et al. (1987) Selective agonists for substance P and neurokinin receptors. *Neuropeptides* 10: 43-54.
- Driban JB, Sitler MR, Barbe MF, et al. (2010) Is osteoarthritis a heterogeneous disease that can be stratified into subsets? *Clinical rheumatology* 29: 123-131.
- Drummond GB and Tom BDM (2011) How can we tell if frogs jump further? *Brit J Pharmacol* 164: 209-212.
- Eddy NB and Leimbach D (1953) Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 107: 385-93.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350: 2572-81.
- Edwards RR, Ness TJ, Weigent DA, et al. (2003) Individual differences in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC): association with clinical variables. *Pain* 106: 427-37.
- Edwards RR, Sarlani E, Wesselmann U, et al. (2005) Quantitative assessment of experimental pain perception: multiple domains of clinical relevance. *Pain* 114: 315-9.

- Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt FW, et al. (2013) Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. *J Pain* 14: 1289-303.
- Eikermann-Haerter K and Moskowitz MA (2008) Animal models of migraine headache and aura. *Curr Opin Neurol* 21: 294-300.
- Eitner A, Hofman GO and Schaible HG (2017) Mechanisms of osteoarthritic pain. Studies in humans and experimental models. *Front Mol Neurosci* 10: 349.
- Elhabazi K, Ayachi S, Ilien B, et al. (2014) Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. *J Vis Exp*: e51264.
- Ellermeier W and Westphal W (1995) Gender differences in pain ratings and pupil reactions to painful pressure stimuli. *Pain* 61: 435-9.
- English JA, Pennington K, Dunn MJ, et al. (2011) The neuroproteomics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 69: 163-72.
- Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, et al. (2000) CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* 275: 31438-43.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, et al. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-5.
- Felson DT (2005) The sources of pain in knee osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 17: 624-28.
- Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, et al. (1998) Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 41: 1064-71.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24.
- Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, et al. (2011a) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 603-10.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, et al. (2011b) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45: 423-9.

- Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, et al. (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 763-9.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. (2004) Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112: 83-93.
- Ferreira-Gomes J, Adaes S, Sousa RM, et al. (2012) Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. *Mol Pain* 8: 50.
- Ferreira J, Campos MM, Araujo R, et al. (2002) The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* 43: 1188-97.
- Field MJ, Oles RJ, Lewis AS, et al. (1997) Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br J Pharmacol* 121: 1513-22.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5: 565-75.
- Fields HL (1992) Is there a facilitating component to central pain modulation? *Am Pain Soc J* 1: 71-78.
- Fields HL, Bry J, Hentall I, et al. (1983) The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci* 3: 2545-52.
- Fields HL and Heinricher MM (1985) Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308: 361-74.
- Fields HL, Heinricher MM and Mason P (1991) Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 14: 219-45.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systemic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *Lancet Neurol* 14: 162-173.
- Finnson KW, Chi Y, Bou-Gharios G, et al. (2012) TGF- $\beta$  signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* 4: 251-68.
- Fischer AA (1987) Pressure algometry over normal muscles. Standard values, validity and reproducibility of pressure threshold. *Pain* 30: 115-26.
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, et al. (2007) The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev* 59: 88-123.

- Flahaut M, Rossier BC and Firsov D (2002) Respective roles of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying proteins (RAMP) in cell surface expression of CRLR/RAMP heterodimeric receptors. *J Biol Chem* 277: 14731-7.
- Fleetwood-Walker SM, Quinn JP, Wallace C, et al. (1999) Behavioural changes in the rat following infection with varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 80 ( Pt 9): 2433-6.
- Fleming CE, Mar FM, Franquinho F, et al. (2009) Transthyretin internalization by sensory neurons is megalin mediated and necessary for its neurotogenic activity. *J Neurosci* 29: 3220-32.
- Fleming CE, Nunes AF and Sousa MM (2009) Transthyretin: more than meets the eye. *Prog Neurobiol* 89: 266-76.
- Fleming CE, Saraiva MJ and Sousa MM (2007) Transthyretin enhances nerve regeneration. *J Neurochem* 103: 831-9.
- Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, et al. (2011) The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 469: 2706-15.
- Fossat P, Dobremez E, Bouali-Benazzouz R, et al. (2010) Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J Neurosci* 30: 1073-85.
- Fox AJ, Bedi A and Rodeo SA (2012) The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. *Sports Health* 4: 340-51.
- Freeman R (2009) Not all neuropathy in diabetes is of diabetic etiology: differential diagnosis of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep* 9: 423-31.
- Freund TF and Gulyas AI (1991) GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex. *J Comp Neurol* 314: 187-99.
- Fricova J, Vejrazka M, Stopka P, et al. (2010) The influence of pre-emptive analgesia on postoperative analgesia and its objective evaluation. *Arch Med Sci* 6: 764-71.
- Gaetani S, Bellovino D, Aprea M, et al. (2002) Hepatic synthesis, maturation and complex formation between retinol-binding protein and transthyretin. *Clin Chem Lab Med* 40: 1211-20.
- Gardell LR, Wang R, Burgess SE, et al. (2002) Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. *J Neurosci* 22: 6747-55.

- Garrison DW and Foreman RD (1994) Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain* 58: 309-15.
- Gaumann DM and Yaksh TL (1988) Intrathecal somatostatin in rats: antinociception only in the presence of toxic effects. *Anesthesiology* 68: 733-42.
- Ge HY, Madeleine P and Arendt-Nielsen L (2004) Sex differences in temporal characteristics of descending inhibitory control: an evaluation using repeated bilateral experimental induction of muscle pain. *Pain* 110: 72-8.
- Gelinas C, Loisel CG, LeMay S, et al. (2008) Theoretical, psychometric, and pragmatic issues in pain measurement. *Pain Manag Nurs* 9: 120-30.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. (2005) Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 434: 644-8.
- Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. (2015) Osteoarthritis. *Lancet* 386: 376-87.
- Gold MS and Gebhart GF (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16: 1248-57.
- Goldberg DS and McGee SJ (2011) Pain as a global public health priority. *BMC Public Health* 11: 770.
- Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, et al. (2008) Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3: iii75-82.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, et al. (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6666-70.
- Gonzalez-Nunez V and Rodriguez RE (2009) The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR J* 50: 373-86.
- Goodwin LD (2002) Changing conceptions of measurement validity: an update on the new standards. *J Nurs Educ* 41: 100-6.
- Gordon WJ, Conzemius MG, Riedesel E, et al. (2003) The relationship between limb function and radiographic osteoarthrosis in dogs with stifle osteoarthrosis. *Vet Surg* 32: 451-4.
- Gouarderes C, Cros J and Quirion R (1985) Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. *Neuropeptides* 6: 331-42.

- Grassel S and Muschter D (2017) Peripheral Nerve Fibers and Their Neurotransmitters in Osteoarthritis Pathology. *Int J Mol Sci* 18.
- Graven-Nielsen T, Wodehouse T, Langford RM, et al. (2012) Normalization of widespread hyperesthesia and facilitated spatial summation of deep-tissue pain in knee osteoarthritis patients after knee replacement. *Arthritis Rheum* 64: 2907-16.
- Greenland S, Senn SJ, Rothman KJ, et al. (2016) Statistical tests, *P* values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *Eur J Epidemiol* 31: 337-350.
- Grevenstein J, Michiels I, Arens-Corell M, et al. (1991) Cartilage changes in rats induced by papain and the influence of treatment with N-acetylglucosamine. *Acta Orthop Belg* 57: 157-61.
- Guerra LT, Rosa AR, Romani RF, et al. (2009) Serum transferrin and serum prealbumin as markers of response to nutritional support in patients with esophageal cancer. *Nutr Hosp* 24: 241-2.
- Guillot M, Chartrand G, Chav R, et al. (2015) [(18)F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography of the cat brain: A feasibility study to investigate osteoarthritis-associated pain. *Veterinary Journal* 204: 299-303.
- Guillot M, Moreau M, Heit M, et al. (2013) Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet J* 196: 360-7.
- Guillot M, Taylor PM, Rialland P, et al. (2014) Evoked temporal summation in cats to highlight central sensitization related to osteoarthritis-associated chronic pain: a preliminary study. *PLoS One* 9: e97347.
- Guingamp C, Gegout-Pottier P, Philippe L, et al. (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 40: 1670-9.
- Guo SL, Han CT, Jung JL, et al. (2014) Cystatin C in cerebrospinal fluid is upregulated in elderly patients with chronic osteoarthritis pain and modulated through matrix metalloproteinase 9-specific pathway. *Clin J Pain* 30: 331-9.
- Guy J, Vaudry H and Pelletier G (1982) Further studies on the identification of neurons containing immunoreactive alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) in the rat brain. *Brain Res* 239: 265-70.

- Guzman RE, Evans MG, Bove S, et al. (2003) Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31: 619-24.
- Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, et al. (2001) Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma* 18: 187-201.
- Handwerker HO, Kilo S and Reeh PW (1991) Unresponsive afferent nerve fibres in the sural nerve of the rat. *J Physiol* 435: 229-42.
- Hannan MT, Felson DT and Pincus T (2000) Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 27: 1513-7.
- Hardingham TE, Bayliss MT, Rayan V, et al. (1992) Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage. *Br J Rheumatol* 31 Suppl 1: 1-6.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-88.
- Harmon LD and Lewis ER (1968) Neural modeling. *Adv Biomed Eng Med Phys* 1: 119-241.
- Harris MB, Ju H, Venema VJ, et al. (2001) Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 276: 16587-91.
- Harrison S and Geppetti P (2001) Substance p. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 555-76.
- Harvey VL and Dickenson AH (2009) Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain* 5: 18.
- Haseeb A and Haqqi TM (2013) Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol* 146: 185-96.
- Haupt H and Heide K (1966) [Crystallization of prealbumin from human serum]. *Experientia* 22: 449-51.
- Havelin J, Imbert I, Cormier J, et al. (2016) Central Sensitization and Neuropathic Features of Ongoing Pain in a Rat Model of Advanced Osteoarthritis. *J Pain* 17: 374-82.
- Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, et al. (2005) Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Mol Pharmacol* 67: 1655-65.
- Hay DL and Walker CS (2017) CGRP and its receptors. *Headache*.



- Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, et al. (2006) Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38: 234-43.
- Hayes AG, Arendt-Nielsen L and Tate S (2014) Multiple mechanisms have been tested in pain-how can we improve the chances of success? *Curr Opin Pharmacol* 14: 11-7.
- He XH, Zang Y, Chen X, et al. (2010) TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* 151: 266-79.
- Healey JH, Vigorita VJ and Lane JM (1985) The coexistence and characteristics of osteoarthritis and osteoporosis. *J Bone Joint Surg Am* 67: 586-92.
- Hedo G, Laird JM and Lopez-Garcia JA (1999) Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience* 92: 309-18.
- Hennebry SC (2009) Evolutionary changes to transthyretin: structure and function of a transthyretin-like ancestral protein. *FEBS J* 276: 5367-79.
- Heppelmann B and Pawlak M (1997) Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 73: 377-82.
- Herrera-Marschitz M, Gojny M, You ZB, et al. (1997) On the release of glutamate and aspartate in the basal ganglia of the rat: interactions with monoamines and neuropeptides. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 489-95.
- Hershey AD, Dykema PE and Krause JE (1991) Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *J Biol Chem* 266: 4366-74.
- Hjelm-Bjorkman AK, Rita H and Tulamo RM (2009) Psychometric testing of the Helsinki chronic pain index by completion of a questionnaire in Finnish by owners of dogs with chronic signs of pain caused by osteoarthritis. *Am J Vet Res* 70: 727-34.
- Hill R (2000) NK1 (substance P) receptor antagonists - why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci* 21: 244-6.
- Hiramatsu T, Nakanishi K, Yoshimura S, et al. (2014) The dorsolateral prefrontal network is involved in pain perception in knee osteoarthritis patients. *Neurosci Lett* 581: 109-14.



- Hochberg MC (2015) Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies. *Osteoarthritis Cartilage* 23 Suppl 1: S18-21.
- Hoegh-Andersen P, Tanko LB, Andersen TL, et al. (2004) Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 6: R169-80.
- Hokfelt T, Bartfai T and Bloom F. (2003) Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol* 2: 463-72.
- Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ, et al. (2000) Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology* 39: 1337-56.
- Hokfelt T, Ljungdahl A, Steinbusch H, et al. (1978) Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 3: 517-38.
- Hokfelt T, Millhorn D, Seroogy K, et al. (1987) Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia* 43: 768-80.
- Holton L, Reid J, Scott EM, et al. (2001) Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. *Vet Rec* 148: 525-31.
- Holton LL, Scott EM, Nolan AM, et al. (1998) Comparison of three methods used for assessment of pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 212: 61-6.
- Hong P, Wu X and Liu Y (2017) Calcitonin gene-related peptide monoclonal antibody for preventive treatment of episodic migraine: A meta analysis. *Clin Neurol Neurosurg* 154: 74-78.
- Hook V, Funkelstein L, Lu D, et al. (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 393-423.
- Hostetler ED, Joshi AD, Sanabria-Bohórquez S, et al. (2013) In vivo quantification of calcitonin gene-related peptide receptor occupancy by telcagepant in rhesus monkey and human brain using the positron emission tomography tracer [<sup>11</sup>C]MK-4232. *J Pharmacol Exp Ther* 347: 478-86.
- Hou X, Xie F and Sweedler JV (2012) Relative quantitation of neuropeptides over a thousand-fold concentration range. *J Am Soc Mass Spectrom* 23: 2083-93.
- Hu P, Bembrick AL, Keay KA, et al. (2007) Immune cell involvement in dorsal root ganglia

- and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* 21: 599-616.
- Hu HJ and Gereau RWt (2011) Metabotropic glutamate receptor 5 regulates excitability and Kv4.2-containing K(+) channels primarily in excitatory neurons of the spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 105: 3010-21.
- Hu P and McLachlan EM (2002) Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. *Neuroscience* 112: 23-38.
- Huang J, Zhang X and McNaughton PA (2006) Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol* 17: 638-45.
- Hunt SP and Mantyh PW (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2: 83-91.
- Hyytiainen HK, Molsa SH, Junnila JT, et al. (2012) Use of bathroom scales in measuring asymmetry of hindlimb static weight bearing in dogs with osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 25: 390-6.
- Im HJ, Kim JS, Li X, et al. (2010) Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* 62: 2995-3005.
- Imamura Y, Kawamoto H and Nakanishi O (1997) Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res* 116: 97-103.
- Imbe H, Iwai-Liao Y and Senba E (2006) Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci* 11: 2179-92.
- Innes JF and Clegg P (2010) Comparative rheumatology: what can be learnt from naturally occurring musculoskeletal disorders in domestic animals? *Rheumatology (Oxford)* 49: 1030-9.
- Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, et al. (2007) Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128: 272-82.
- Izumi M, Petersen KK, Laursen MB, et al. (2017) Facilitated temporal summation of pain correlates with clinical pain intensity after hip arthroplasty. *Pain* 158: 323-32.
- Jaeger K, Selent C, Jaehme W, et al. (2008) The genetics of osteoarthritis in STR/ort mice. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 607-14.

- Jay GD, Britt DE and Cha CJ (2000) Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 27: 594-600.
- Jensen TS, Baron R, Haanpaa M, et al. (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152: 2204-5.
- Jimenez PA, Glasson SS, Trubetskoy OV, et al. (1997) Spontaneous osteoarthritis in Dunkin Hartley guinea pigs: histologic, radiologic, and biochemical changes. *Laboratory animal science* 47: 598-601.
- Ji RR, Berta T and Nedergaard M (2013) Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1: S10-28.
- Ji RR, Chamesian A and Zhang YQ (2016) Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* 354: 572-77.
- Ji RR, Xu ZZ and Gao YJ (2014) Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov* 13: 533-48.
- Johansen JP, Fields HL and Manning BH (2001) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8077-82.
- Johnsen E, Leknes S, Wilson SR, et al. (2015) Liquid chromatography-mass spectrometry platform for both small neurotransmitters and neuropeptides in blood, with automatic and robust solid phase extraction. *Sci Rep* 5: 9308.
- Johnson C (2016) Research Tools for the Measurement of Pain and Nociception. *Animals (Basel)* 6.
- Joswig AJ, Mitchell A, Cummings KJ, et al. (2017) Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res Ther* 8: 42.
- Julius D and Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-10.
- Kabat EA, Moore DH and Landow H (1942) An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins. *J Clin Invest* 21: 571-7.
- Kajander KC, Sahara Y, Iadarola MJ, et al. (1990) Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides* 11: 719-28.

- Kammerman P, Koller A and Loram L (2007) Postoperative administration of the analgesic tramadol, but not the selective cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib, abolishes postoperative hyperalgesia in a new model of postoperative pain in rats. *Pharmacology* 80: 244-8.
- Kane BE, Svensson B and Ferguson DM (2006) Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J* 8: E126-37.
- Kang JY, Yoo DY, Lee KY, et al. (2016) SP, CGRP changes in pyridoxine induced neuropathic dogs with nerve growth factor gene therapy. *BMC Neurosci* 17: 1.
- Kapatkin AS, Nordquist B, Garcia TC, et al. (2016) Effect of single dose radiation therapy on weight-bearing lameness in dogs with elbow osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 29: 338-43.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 33-42.
- Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka T, et al. (2011) Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacology* 60: 609-16.
- Kawamoto K, Aoki J, Tanaka A, et al. (2002) Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J Immunol* 168: 6412-9.
- Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, et al. (2008) Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med* 14: 331-6.
- Kehl LJ, Trempe TM and Hargreaves KM (2000) A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. *Pain* 85: 333-43.
- Kennedy DL, Kemp HI, Ridout D, et al. (2016) Reliability of conditioned pain modulation: a systematic review. *Pain* 157: 2410-19.
- Kieffer BL and Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66: 285-306.
- Kim CH, Oh Y, Chung JM, et al. (2002) Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci Lett* 323: 125-8.

- Kim D (1991) Calcitonin-gene-related peptide activates the muscarinic-gated K<sup>+</sup> current in atrial cells. *Pflugers Arch* 418: 338-45.
- Kim JL, Moon CW, Son YS, et al. (2016) Combined Effect of Bilateral Ovariectomy and Anterior Cruciate Ligament Transection With Medial Meniscectomy on the Development of Osteoarthritis Model. *Ann Rehabil Med* 40: 583-91.
- Kim JS, Ahmadiania K, Li X, et al. (2015) Development of an Experimental Animal Model for Lower Back Pain by Percutaneous Injury-Induced Lumbar Facet Joint Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 230: 2837-47.
- King PJ, Widdowson PS, Doods HN, et al. (1999) Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem* 73: 641-6.
- King T, Gardell LR, Wang R, et al. (2005) Role of NK-1 neurotransmission in opioid-induced hyperalgesia. *Pain* 116: 276-88.
- Klee WA and Nirenberg M (1976) Mode of action of endogenous opiate peptides. *Nature* 263: 609-12.
- Klinck MP, Mogil JS, Moreau M, et al. (2017) Translational pain assessment: Could natural animal models be the missing link? *Pain*.
- Klinck MP, Riolland P, Guillot M, et al. (2015) Preliminary Validation and Reliability Testing of the Montreal Instrument for Cat Arthritis Testing, for Use by Veterinarians, in a Colony of Laboratory Cats. *Animals (Basel)* 5: 1252-67.
- Knazovicky D, Helgeson ES, Case B, et al. (2016) Widespread somatosensory sensitivity in naturally occurring canine model of osteoarthritis. *Pain* 157: 1325-32.
- Koch T, Widera A, Bartzsch K, et al. (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 67: 280-7.
- Kolasinski SL, Haines KA, Siegel EL, et al. (1992) Neuropeptides and inflammation. A somatostatin analog as a selective antagonist of neutrophil activation by substance P. *Arthritis Rheum* 35: 369-75.
- Kolettas E, Muir HI, Barrett JC, et al. (2001) Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor. *Rheumatology (Oxford)* 40: 1146-56.

- Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, et al. (1986) Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7074-8.
- Kovacs L, Jurkovich V, Bakony M, et al. (2014) Welfare implication of measuring heart rate and heart rate variability in dairy cattle: literature review and conclusions for future research. *Animal* 8: 316-30.
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, et al. (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281: 1640-5.
- Kraus E, Le Bars D and Besson JM (1981) Behavioral confirmation of "diffuse noxious inhibitory controls" (DNIC) and evidence for a role of endogenous opiates. *Brain Res* 206: 495-9.
- Kuchler-Bopp S, Dietrich JB, Zaepfel M, et al. (2000) Receptor-mediated endocytosis of transthyretin by ependymoma cells. *Brain Res* 870: 185-94.
- Kuner R (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 16: 1258-66.
- Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, et al. (2016) Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res* 11: 19.
- Kwan Tat S, Lajeunesse D, Pelletier JP, et al. (2010) Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24: 51-70.
- Kyostio-Moore S, Nambiar B, Hutto E, et al. (2011) STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers. *Comp Med* 61: 346-55.
- LaBuda CJ and Fuchs PN (2000) A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp Neurol* 163: 490-4.
- Labus JS, Van Horn JD, Gupta A, et al. (2015) Multivariate morphological brain signatures predict patients with chronic abdominal pain from healthy control subjects. *Pain* 156: 1545-54.
- Labuz D, Schmidt Y, Schreiter A, et al. (2009) Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. *J Clin Invest* 119: 278-86.
- Lai J, Luo MC, Chen Q, et al. (2006) Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat Neurosci* 9: 1534-40.
- Lakes EH and Allen KD (2016) Gait analysis methods for rodent models of arthritic disorders: reviews and recommendations. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 1837-49.

- Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, et al. (1997) Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 100: 408-14.
- Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, et al. (2014) Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 24: 263-71.
- Lan L, Yao Y, Ping J, et al. (2017) Recent Progress in Nanomaterial-Based Optical Aptamer Assay for the Detection of Food Chemical Contaminants. *ACS Appl Mater Interfaces* 9: 23287-301.
- Lane DM and Hill SA (2016) Pressure algometry measurement of canine muscular pain near the thoracolumbar junction: evaluation of a modified technique. *Vet Anaesth Analg* 43: 227-34.
- Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, et al. (2010) Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 363: 1521-31.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, et al. (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7: 447-9.
- Larsson M, Pettersson T and Carlstrom A (1985) Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *Gen Comp Endocrinol* 58: 360-75.
- Lascelles BDX, Brown DC, Maixner W, et al. (2017) Spontaneous painful disease in companion animals can facilitate the development of chronic pain therapies for humans. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 31329-8.
- Lascelles BD, Hansen BD, Roe S, et al. (2007) Evaluation of client-specific outcome measures and activity monitoring to measure pain relief in cats with osteoarthritis. *J Vet Intern Med* 21: 410-6.
- Latremoliere A and Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10: 895-926.
- Lautenbacher S, Kunz M, Strate P, et al. (2005) Age effects on pain thresholds, temporal summation and spatial summation of heat and pressure pain. *Pain* 3: 410-418.
- Laux-Biehlmann A, Boyken J, Dahllof H, et al. (2016) Dynamic weight bearing as a non-reflexive method for the measurement of abdominal pain in mice. *Eur J Pain* 20: 742-52.



- Law PY, Wong YH and Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389-430.
- Le Bars D and Adam F (2002) [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann Fr Anesth Reanim* 21: 315-35.
- Le Bars D, Dickenson A and Besson J (1979a) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6: 283-304.
- Le Bars D, Dickenson AH and Besson JM (1979b) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6: 283-304.
- Le Bars D, Dickenson AH and Besson JM (1979c) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 6: 305-27.
- Leach MC, Klaus K, Miller AL, et al. (2012) The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 7: e35656.
- Lee YS, Muthu D, Hall SM, et al. (2014) Discovery of amphipathic dynorphin A analogues to inhibit the neuroexcitatory effects of dynorphin A through bradykinin receptors in the spinal cord. *J Am Chem Soc* 136: 6608-6616.
- Lennerz JK, Ruhle V, Ceppa EP, et al. (2008) Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol* 507: 1277-99.
- Levine JD, Gordon NC and Fields HL (1978) The mechanism of placebo analgesia. *Lancet* 2: 654-7.
- Li J, Simone DA and Larson AA (1999) Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 79: 75-82.
- Li L and Jiang BE (2015) Serum and synovial fluid chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1 concentrations correlates with symptomatic severity in patients with knee osteoarthritis. *Ann Clin Biochem* 52: 276-82.
- Li X, Masliah E, Reixach N, et al. (2011) Neuronal production of transthyretin in human and murine Alzheimer's disease: is it protective? *J Neurosci* 31: 12483-90.



- Li YH, Tavallae G, Tokar T, et al. (2016) Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 1577-86.
- Ligon CO, Moloney RD and Greenwood-Van Meerveld B (2016) Targeting Epigenetic Mechanisms for Chronic Pain: A Valid Approach for the Development of Novel Therapeutics. *J Pharmacol Exp Ther* 357: 84-93.
- Little CB and Hunter DJ (2013) Post-traumatic osteoarthritis: from mouse models to clinical trials. *Nat Rev Rheumatol* 9: 485-97.
- Little CB and Zaki S (2012) What constitutes an "animal model of osteoarthritis" – the need for consensus? *Osteoarthritis Cartilage* 20: 261-267.
- Littlewood NK, Todd AJ, Spike RC, et al. (1995) The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience* 66: 597-608.
- Liu S, Liu YP, Huang ZJ, et al. (2015) Wnt/Ryk signaling contributes to neuropathic pain by regulating sensory neuron excitability and spinal synaptic plasticity in rats. *Pain* 156: 2572-2584.
- Liu P, Okun A, Guo RC, et al. (2011) Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. *Neurosci Lett* 493: 72-75.
- Liu XJ, Zhang Y, Liu T, et al. (2014) Nociceptive neurons regulate innate and adaptive immunity and neuropathic pain through MyD88 adapter. *Cell Res* 24: 1374-7.
- Liz MA, Fleming CE, Nunes AF, et al. (2009) Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system. *Biochem J* 419: 467-74.
- Lopez-Gonzalez MJ, Landry M and Favereaux A (2017) MicroRNA and chronic pain: From mechanisms to therapeutic potential. *Pharmacol Ther.*
- Lorentz J and Grassel S (2014) Experimental osteoarthritis models in mice. *Methods Mol Biol* 1194: 401-19.
- Lotz M (1999) The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25: 269-82.
- Loughlin J, Mustafa Z, Smith A, et al. (2000) Linkage analysis of chromosome 2q in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39: 377-81.
- Ludbrook J (2013) Should we use one-sided or two-sided *P* values in tests of significance? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40: 357-361.

- Lull ME, Freeman WM, VanGuilder HD, et al. (2010) The use of neuroproteomics in drug abuse research. *Drug Alcohol Depend* 107: 11-22.
- Lum ZP, Hakala BE, Mort JS, et al. (1996) Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 166: 351-9.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, et al. (2001) Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 21: 1868-75.
- Lynch JL, Gallus NJ, Ericson ME, et al. (2008) Analysis of nociception, sex and peripheral nerve innervation in the TMEV animal model of multiple sclerosis. *Pain* 136: 293-304.
- Ma QP (2001) Vanilloid receptor homologue, VRL1, is expressed by both A- and C-fiber sensory neurons. *Neuroreport* 12: 3693-5.
- Maixner W, Dubner R, Bushnell MC, et al. (1986) Wide-dynamic-range dorsal horn neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious heat stimuli. *Brain Res* 374: 385-8.
- Malfait AM and Schnitzer TJ (2013) Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 9: 654-64.
- Mangaiarkkarsi A, Rameshkannan S and Ali RM (2015). Effect of Gabapentin and Pregabalin in Rat Model of Taxol Induced Neuropathic. *Pain J Clin Diagn Res* 9: FF11-14.
- Man GS and Mologhianu G (2014) Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J Med Life* 7: 37-41.
- Mantyh PW, Allen CJ, Ghilardi JR, et al. (1995) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2622-6.
- Mao J (2009) Translational pain research: achievements and challenges. *J Pain* 10: 1001-11.
- Mao J and Cjen LL (2000) Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. *Pain* 87: 7-17.
- Marceau F, Hess JF and Bachvarov DR (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-86.
- Marchand S, Li J and Charest J (1995) Effects of caffeine on analgesia from transcutaneous electrical nerve stimulation. *N Engl J Med* 333: 325-6.

- Marics I, Malapert P, Reynders A, et al. (2014) Acute heat-evoked temperature sensation is impaired but not abolished in mice lacking TRPV1 and TRPV3 channels. *PLoS One* 9: e99828.
- Marker CL and Pomonis JD (2012) The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol Biol* 851: 239-48.
- Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, et al. (2008) Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 351-84.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, et al. (1999) Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol* 405: 450-471.
- Martin LL, Setescak LL, Spaulding TC, et al. (1984) Dibenz[b,e]oxepinalkanoic acids as nonsteroidal antiinflammatory agents. 4. Synthesis and evaluation of 4-(4,10-dihydro-10-oxothieno[3,2-c] [1]benzoxepin-8-yl)butanol and -butyric acid and related derivatives. *J Med Chem* 27: 372-6.
- Martin TJ, Buechler NL, Kahn W, et al. (2004) Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned operant responding in the rat: a model for postoperative pain. *Anesthesiology* 101: 191-203.
- Martini L, Hastrup H, Holst B, et al. (2002) NK1 receptor fused to beta-arrestin displays a single-component, high-affinity molecular phenotype. *Mol Pharmacol* 62: 30-7.
- Marvizon JC, Chen W and Murphy N (2009) Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* 517: 51-68.
- Marvizon JC, Perez OA, Song B, et al. (2007) Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic alpha2C receptors. *Neuroscience* 148: 250-65.
- Massardier D and Hunt PF (1989) A direct non-opiate interaction of dynorphin-(1-13) with the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Eur J Pharmacol* 170: 125-6.
- Matsas R, Kenny AJ and Turner AJ (1984) The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 223: 433-40.

- Mauderli AP, Acosta-Rua A and Vierck CJ (2000) An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods* 97: 19-29.
- McEwen BS and Kalia M (2010) The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism* 59: S9-15.
- McKelvey L, Shorten GD and O'Keefe GW (2013) Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. *J Neurochem* 124: 276-89.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-9.
- McQuay HJ, Tramer M, Nye BA, et al. (1996) A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68: 217-27.
- Mease PJ, Hanna S, Frakes EP, et al. (2011) Pain mechanisms in osteoarthritis: understanding the role of central pain and current approaches to its treatment. *J Rheumatol* 38: 1546-51.
- Meini S and Maggi CA (2008) Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflamm Res* 57: 351-61.
- Mellor DJ and Murray L (1989) Effects of tail docking and castration on behaviour and plasma cortisol concentrations in young lambs. *Res Vet Sci* 46: 387-91.
- Melzack R and Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971-9.
- Merg F, Filliol D, Usynin I, et al. (2006) Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor. *J Neurochem* 97: 292-301.
- Messier SP (1994) Osteoarthritis of the knee and associated factors of age and obesity: effects on gait. *Med Sci Sports Exerc* 26: 1446-52.
- Meyer RA CJ, Raja SN. 1994. *Peripheral neural mechanisms of nociception*. Dans: Wall PD, Melzack R.
- Micheva KD, Taylor CP and Smith SJ (2006) Pregabalin reduces the release of synaptic vesicles from cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 70: 467-76.
- Milinkeviciute G, Gentile C and Neely GG (2012) Drosophila as a tool for studying the conserved genetics of pain. *Clin Genet* 82: 359-66.
- Miller AL and Leach MC (2015) The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? *PLoS One* 10: e0136000.

- Miller LK, Hou X, Rodriguiz RM, et al. (2011) Mice deficient in endothelin-converting enzyme-2 exhibit abnormal responses to morphine and altered peptide levels in the spinal cord. *J Neurochem* 119: 1074-85.
- Mimeault M, Fournier A, Dumont Y, et al. (1991) Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on calcitonin gene-related peptide receptors in brain and periphery. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 1084-90.
- Minami M, Toya T, Katao Y, et al. (1993) Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett* 329: 291-5.
- Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, et al. (2011) Assessment of gait in a rat model of myofascial inflammation using the CatWalk system. *Spine (Phila Pa 1976)* 36: 1760-4.
- Moghieb A, Bramlett HM, Das JH, et al. (2016) Differential Neuroproteomic and Systems Biology Analysis of Spinal Cord Injury. *Mol Cell Proteomics* 15: 2379-95.
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10: 283-94.
- Mogil JS (2017) Laboratory environmental factors and pain behavior: the relevance of unknown unknowns to reproducibility and translation. *Lab Anim (NY)* 46: 136-41.
- Mogil JS and Crager SE (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112: 12-5.
- Mogil JS, Davis KD and Derbyshire SW (2010) The necessity of animal models in pain research. *Pain* 151: 12-7.
- Mogil JS, Miermeister F, Seifert F, et al. (2005) Variable sensitivity to noxious heat is mediated by differential expression of the CGRP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12938-43.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, et al. (1999) Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80: 67-82.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, et al. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-8.
- Monach P, Hattori K, Huang H, et al. (2007) The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice. *Methods Mol Med* 136: 269-82.

- Monteiro BP, Klinck MP, Moreau M, et al. (2016) Analgesic efficacy of an oral transmucosal spray formulation of meloxicam alone or in combination with tramadol in cats with naturally occurring osteoarthritis. *Vet Anaesth Analg* 43: 643-51.
- Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ, et al. (1984) Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3337-40.
- Moreau M, Dupuis J, Bonneau NH, et al. (2004) Clinical evaluation of a powder of quality elk velvet antler for the treatment of osteoarthrosis in dogs. *Can Vet J* 45: 133-9.
- Moreau M, Guillot M, Pelletier JP, et al. (2013) Kinetic peak vertical force measurement in cats afflicted by coxarthrosis: data management and acquisition protocols. *Res Vet Sci* 95: 219-24.
- Moreau M, Lussier B, Ballaz L, et al. (2014) Kinetic measurements of gait for osteoarthritis research in dogs and cats. *Can Vet J* 55: 1057-65.
- Moreau M, Lussier B, Pelletier JP, et al. (2012) Brachystemma calycinum D. Don Effectively Reduces the Locomotor Disability in Dogs with Naturally Occurring Osteoarthritis: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 646191.
- Moreau M, Pelletier JP, Lussier B, et al. (2013) A posteriori comparison of natural and surgical destabilization models of canine osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013: 180453.
- Morgan D, Carter CS, DuPree JP, et al. (2008) Evaluation of prescription opioids using operant-based pain measures in rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 16: 367-75.
- Morton CM, Reid J, Scott EM, et al. (2005) Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs. *Am J Vet Res* 66: 2154-66.
- Morton CR, Hutchison WD and Hendry IA (1988) Release of immunoreactive somatostatin in the spinal dorsal horn of the cat. *Neuropeptides* 12: 189-97.
- Motulsky HJ (2015) Common misconceptions about data analysis and statistics. *Brit J Pharmacol* 172: 2126-2132.
- Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, et al. (2007) Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* 12: 13-21.

- Moulton EA, Elman I, Pendse G, et al. (2011) Aversion-related circuitry in the cerebellum: responses to noxious heat and unpleasant images. *J Neurosci* 31: 3795-804.
- Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, et al. (1988) Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25: 195-205.
- Murakami S, Lefebvre V and de Crombrughe B (2000) Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 275: 3687-92.
- Murakami T, Ohsawa Y, Zhenghua L, et al. (2010) The transthyretin gene is expressed in Schwann cells of peripheral nerves. *Brain Res* 1348: 222-5.
- Murphy R (2018) On the use of one-sided statistical tests in biomedical research. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45: 109-114.
- Murray CW, Porreca F and Cowan A (1988) Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J Pharmacol Methods* 20: 175-86.
- Mwale F, Rampersad S, Richard H, et al. (2011) The constitutive expression of type x collagen in mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients is reproduced in a rabbit model of osteoarthritis. *J Tissue Eng* 2011: 587547.
- Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, et al. (1997) Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* 61: 1861-78.
- Nagase H, Kumakura S and Shimada K (2012) Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65: 29-36.
- Nakanishi S (1991) Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* 14: 123-36.
- Nakazato-Imasato E and Kurebayashi Y (2009) Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sci* 84: 622-6.
- Namkung Y, Radresa O, Armando S, et al. (2016) Quantifying biased signaling in GPCRs using BRET-based biosensors. *Methods* 92: 5-10.
- Nayak A, Salt G, Verma SK, et al. (2015) Proteomics Approach to Identify Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. *Int Rev Neurobiol* 121: 59-86.



- Negraes PD, Trujillo CA, Pillat MM, et al. (2015) Roles of kinins in the nervous system. *Cell Transplant* 24: 613-23.
- Neogi T (2013) The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1145-53.
- Ness TJ (1999) Models of Visceral Nociception. *ILAR J* 40: 119-28.
- Ness TJ and Gebhart GF (1988) Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Res* 450: 153-69.
- Neubert JK, Widmer CG, Malphurs W, et al. (2005) Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *Pain* 116: 386-95.
- Neugebauer V, Galhardo V, Maione S, et al. (2009) Forebrain pain mechanisms. *Brain Res Rev* 60: 226-42.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, et al. (1996) Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384: 360-4.
- Ni M, Wei W, Feng Q, et al. (2013) Transthyretin as a potential serological marker for the diagnosis of patients with early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 31: 394-9.
- Niederberger E and Geisslinger G (2008) The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *FASEB J* 22: 3432-42.
- Njuki F, Nicholl CG, Howard A, et al. (1993) A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin Sci (Lond)* 85: 385-8.
- Noguchi K, Senba E, Morita Y, et al. (1990) Co-expression of alpha-CGRP and beta-CGRP mRNAs in the rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett* 108: 1-5.
- Norcini M, Sideris A, Martin Hernandez LA, et al. (2014) An approach to identify microRNAs involved in neuropathic pain following a peripheral nerve injury. *Front Neurosci* 8: 266.
- Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, et al. (2000) The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 165: 3402-10.
- Noy N, Slosberg E and Scarlata S (1992) Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin. *Biochemistry* 31: 11118-24.
- Nozaki C, Vergnano AM, Filliol D, et al. (2011) Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nat Neurosci* 14: 1017-22.



- Nunes AF, Saraiva MJ and Sousa MM (2006) Transthyretin knockouts are a new mouse model for increased neuropeptide Y. *FASEB J* 20: 166-8.
- Obata K and Noguchi K (2004) MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci* 74: 2643-53.
- Obrosova IG (2009) Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics* 6: 638-47.
- Okun A, Liu P, Davis P, et al. (2012) Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain* 153: 924-33.
- Olausson P, Ghafouri B, Backryd E, et al. (2017) Clear differences in cerebrospinal fluid proteome between women with chronic widespread pain and healthy women - a multivariate explorative cross-sectional study. *J Pain Res* 10: 575-90.
- Orduna AR and Beaudry F (2016) Characterization of endoproteolytic processing of dynorphins by proprotein convertases using mouse spinal cord S9 fractions and mass spectrometry. *Neuropeptides* 57: 85-94.
- Orduna Valls JM, Vallejo R, Lopez Pais P, et al. (2017) Anatomic and Ultrasonographic Evaluation of the Knee Sensory Innervation: A Cadaveric Study to Determine Anatomic Targets in the Treatment of Chronic Knee Pain. *Reg Anesth Pain Med* 42: 90-98.
- Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, et al. (2011) Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 134.
- Orlowsky EW and Kraus VB (2015) The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive. *J Rheumatol* 42: 363-71.
- Otis C, Gervais J, Guillot M, et al. (2016) Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. *Arthritis Res Ther* 18: 150.
- Otis C, Guillot M, Moreau M, et al. (2017) Spinal neuropeptide modulation and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Neuropeptides* 65: 56-62.
- Otis V, Sarret P and Gendron L (2011) Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone pain. *Neuroscience* 183: 221-9.
- Otsuka M and Yoshioka K (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 73: 229-308.

- Pailleux F and Beaudry F (2012) Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 26: 881-91.
- Pailleux F and Beaudry F (2014) Evaluation of multiple reaction monitoring cubed for the analysis of tachykinin related peptides in rat spinal cord using a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 947-948: 164-7.
- Pailleux F, Lemoine J and Beaudry F (2012) Quantitative mass spectrometry analysis reveals that deletion of the TRPV1 receptor in mice alters substance P and neurokinin A expression in the central nervous system. *Neurochem Res* 37: 2678-85.
- Pailleux F, Vachon P, Lemoine J, et al. (2013) Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides* 47: 261-71.
- Pan S, Aebersold R, Chen R, et al. (2009) Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J Proteome Res* 8: 787-97.
- Paone DV, Shaw AW, Nguyen DN, et al. (2007) Potent, orally bioavailable calcitonin gene-related peptide receptor antagonists for the treatment of migraine: discovery of N-[(3R,6S)-6-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroethyl)azepan-3-yl]-4-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-yl)piperidine-1-carboxamide (MK-0974). *J Med Chem* 50: 5564-7
- Park CK, Xu ZZ, Berta T, et al. (2014) Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron* 82: 47-54.
- Parks EL, Geha PY, Baliki MN, et al. (2011) Brain activity for chronic knee osteoarthritis: dissociating evoked pain from spontaneous pain. *Eur J Pain* 15: 843 e1-14.
- Parra-Torres NM, Cazares-Raga FE and Kouri JB (2014) Proteomic analysis of rat cartilage: the identification of differentially expressed proteins in the early stages of osteoarthritis. *Proteome Sci* 12: 55.
- Patchornik S, Ram E, Ben Shalom N, et al. (2012) Chitosan-hyaluronate hybrid gel intraarticular injection delays osteoarthritis progression and reduces pain in a rat meniscectomy model as compared to saline and hyaluronate treatment. *Adv Orthop* 2012: 979152.

- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, et al. (1995) The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57: 1249-65.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, et al. (1994) All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 605-12.
- Patel YC and O'Neil W (1988) Peptides derived from cleavage of prosomatostatin at carboxyl- and amino-terminal segments. Characterization of tissue and secreted forms in the rat. *J Biol Chem* 263: 745-51.
- Pelletier G, Steinbusch HW and Verhofstad AA (1981) Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-core vesicles. *Nature* 293: 71-2.
- Peng J, Gu N, Zhou L, et al. (2016) Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. *Nat Commun* 7: 12029.
- Penza CW, Horn ME, George ZS, et al. (2017). Comparison of two lumbar manual therapies on temporal summation of pain in healthy volunteers. *J Pain* doi: 10.1016/j.jpain.2017.07.007.
- Perissin L, Facchin P and Porro CA (2003) Tonic pain response in mice: effects of sex, season and time of day. *Life Sci* 72: 897-907.
- Perone MJ and Castro MG (1997) Prohormone and proneuropeptide synthesis and secretion. *Histol Histopathol* 12: 1179-88.
- Petersson IF and Jacobsson LT (2002) Osteoarthritis of the peripheral joints. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16: 741-60.
- Petho G and Reeh PW (2012) Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 92: 1699-775.
- Petrescu N, Micu I, Malek S, et al. (2007) Sources of axonal calcium loading during in vitro ischemia of rat dorsal roots. *Muscle Nerve* 35: 451-7.
- Pettersson T, Carlstrom A and Jornvall H (1987) Different types of microheterogeneity of human thyroxine-binding prealbumin. *Biochemistry* 26: 4572-83.
- Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, et al. (1994) The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol* 36: 244-6.

- Phadke K (1983) Regulation of metabolism of the chondrocytes in articular cartilage--an hypothesis. *J Rheumatol* 10: 852-60.
- Philips BH, Weisshaar CL and Winkelstein BA (2017) Use of the Rat Grimace Scale to Evaluate Neuropathic Pain in a Model of Cervical Radiculopathy. *Comp Med* 67: 34-42.
- Pinter E, Helyes Z and Szolcsanyi J (2006) Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* 112: 440-56.
- Pitkanen P, Westermark P and Cornwell GG, 3rd (1984) Senile systemic amyloidosis. *Am J Pathol* 117: 391-9.
- Ploner M, Lee MC, Wiech K, et al. (2011) Flexible cerebral connectivity patterns subserve contextual modulations of pain. *Cereb Cortex* 21: 719-26.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114: 339-46.
- Pond MJ and Nuki G (1973) Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-8.
- Poole R, Blake S, Buschmann M, et al. (2010) Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3: S10-6.
- Prapunpoj P and Leelawatwattana L (2009) Evolutionary changes to transthyretin: structure-function relationships. *FEBS J* 276: 5330-41.
- Prescott MJ and Lidster K (2017) Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab Animal* 46: 152-156.
- Price DD and Dubner R (1977) Mechanisms of first and second pain in the peripheral and central nervous systems. *J Invest Dermatol* 69: 167-71.
- Pritzker KP (1994) Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis* 53: 406-20.
- Pujol JP and Loyau G (1987) Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci* 41: 1187-98.
- Puttfarcken PS, Han P, Joshi SK, et al. (2010) A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydro naphthalen-2-ol], a novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain* 150: 319-26.

- Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y, et al. (1992) Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 657: 88-105.
- Rahman W, Bauer CS, Bannister K, et al. (2009) Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 5: 45.
- Rahman W, Patel R and Dickenson AH (2015) Electrophysiological evidence for voltage-gated calcium channel 2 (Cav2) modulation of mechano- and thermosensitive spinal neuronal responses in a rat model of osteoarthritis. *Neuroscience* 305: 76-85.
- Ramos-Colon CN, Lee YS, M. Remesic M, et al. (2016) Structure-Activity Relationships of [des-Arg7]Dynorphin A Analogues at the kappa Opioid Receptor. *J Med Chem* 59: 10291-98.
- Randall LO and Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111: 409-19.
- Rasheed Z, Akhtar N and Haqqi TM (2011) Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 50: 838-51.
- Raud J, Lundeberg T, Brodda-Jansen G, et al. (1991) Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1429-35.
- Reeves JL, Jaeger B and Graff-Radford SB (1986) Reliability of the pressure algometer as a measure of myofascial trigger point sensitivity. *Pain* 24: 313-21.
- Regoli D, Boudon A and Fauchere JL (1994) Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 46: 551-99.
- Ren K and Dubner R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 16: 1267-76.
- Rethelyi M, Metz CB and Lund PK (1989) Distribution of neurons expressing calcitonin gene-related peptide mRNAs in the brain stem, spinal cord and dorsal root ganglia of rat and guinea-pig. *Neuroscience* 29: 225-39.
- Reynolds WS, Brown ET, Danford J, et al. (2017) Temporal summation to thermal stimuli is elevated in women with overactive bladder syndrome. *Neurourol Urodyn* 4: 1108-1112.

- Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96: 414-95.
- Reynolds DV (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164: 444-5.
- Rialland P, Authier S, Guillot M, et al. (2012) Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: a prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. *PLoS One* 7: e49480.
- Rialland P, Otis C, Moreau M, et al. (2014) Association between sensitisation and pain-related behaviours in an experimental canine model of osteoarthritis. *Pain* 155: 2071-9.
- Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, et al. (2005) Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology* 65: 812-9.
- Roques BP, Noble F, Dauge V, et al. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45: 87-146.
- Rosa MJ and Seymour B (2014) Decoding the matrix: benefits and limitations of applying machine learning algorithms to pain neuroimaging. *Pain* 155: 864-7.
- Roughan JV and Flecknell PA (2001) Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90, 65-74.
- Ruan MZ, Patel RM, Dawson BC, et al. (2013) Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1355-64.
- Ruda MA, Iadarola MJ, Cohen LV, et al. (1988) In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 622-6.
- Ryan JM, Lascelles BD, Benito J, et al. (2013) Histological and molecular characterisation of feline humeral condylar osteoarthritis. *BMC Vet Res* 9: 110.
- Sagar DR, Burston JJ, Hathway GJ, et al. (2011) The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 7: 88.
- Sah RL, Kim YJ, Doong JY, et al. (1989) Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J Orthop Res* 7: 619-36.

- Saidi M and Beaudry F (2015) Liquid chromatography-electrospray linear ion trap mass spectrometry analysis of targeted neuropeptides in Tac1(-/-) mouse spinal cords reveals significant lower concentration of opioid peptides. *Neuropeptides* 52: 79-87.
- Saidi M, Kamali S and Beaudry F (2016) Characterization of Substance P processing in mouse spinal cord S9 fractions using high-resolution Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Neuropeptides* 59: 47-55.
- Saidi M, Kamali S, Ruiz AO, et al. (2015) Tachykinins Processing is Significantly Impaired in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cord S9 Fractions. *Neurochem Res* 40: 2304-16.
- Sakano Y, Terada N, Ueda H, et al. (2000) Histological study of articular cartilage in experimental rat knee arthritis induced by intracapsular injection of cationic polyethyleneimine. *Med Electron Microsc* 33: 246-57.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, et al. (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410: 471-5.
- Santos-Nogueira E, Redondo Castro E, Mancuso R, et al. (2012) Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29: 898-904.
- Sauro J and Lewis JR (2016) Quantifying the user experience: Practical statistics for user research. 2<sup>nd</sup> Ed., ISBN-13: 978-0128023082, Morgan Kaufman – Elsevier / Cambridge, MA, 351 pp.
- Scanzello CR and Goldring SR (2012) The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51: 249-57.
- Scanzello CR, Plaas A and Crow MK (2008) Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol* 20: 565-72.
- Schaible HG (2007) Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol*: 3-28.
- Schaible HG, Del Rosso A and Matucci-Cerinic M (2005) Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum Dis Clin North Am* 31: 77-101, ix.
- Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, et al. (2009) Joint pain. *Exp Brain Res* 196: 153-62.
- Schally AV and Meyers CA (1980) Somatostatin, basic and clinical studies. A review. *Mater Med Pol* 12: 28-32.



- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, et al. (1998) The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 101: 2080-91.
- Scharrer E and Scharrer B (1954) Hormones produced by neurosecretory cells. *Recent Prog Horm Res* 10: 183-240.
- Schmelz M and Petersen LJ (2001) Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci* 16: 33-7.
- Schmidt MM and Dringen R (2009) Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics* 1: 1.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439: 283-9.
- Schulte I, Tammen H, Selle H, et al. (2005) Peptides in body fluids and tissues as markers of disease. *Expert Rev Mol Diagn* 5: 145-57.
- Schweinhart P, Glynn C, Brooks J, et al. (2006) An fMRI study of cerebral processing of brush-evoked allodynia in neuropathic pain patients. *Neuroimage* 32: 256-65.
- Schweitzer P, Madamba S and Siggins GR (1990) Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature* 346: 464-7.
- Scott I, Midha A, Rashid U, et al. (2009) Correlation of gene and mediator expression with clinical endpoints in an acute interleukin-1beta-driven model of joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 790-7.
- Sellam J and Berenbaum F (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6: 625-35.
- Serge M. 2009. *Le phénomène de la douleur*.
- Sherrington CS (1906) Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol* 34: 1-50.
- Sivilotti L and Woolf CJ (1994) The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 72: 169-79.
- Skidgel RA and Erdos EG (1987) Cleavage of peptide bonds by angiotensin I converting enzyme. *Agents Actions Suppl* 22: 289-96.



- Sophia Fox AJ, Bedi A and Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1: 461-8.
- Soprano DR, Herbert J, Soprano KJ, et al. (1985) Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J Biol Chem* 260: 11793-8.
- Sorge RE, LaCroix-Fralish ML, Tuttle AH, et al. (2011) Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *J Neurosci* 31: 15450-4.
- Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, et al. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11: 629-32.
- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, et al. (2011) The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 7: 55.
- Sousa MM and Saraiva MJ (2001) Internalization of transthyretin. Evidence of a novel yet unidentified receptor-associated protein (RAP)-sensitive receptor. *J Biol Chem* 276: 14420-5.
- Sousa MM, Yan SD, Stern D, et al. (2000) Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation. *Lab Invest* 80: 1101-10.
- Spiess J and Vale W (1980) Multiple forms of somatostatin-like activity in rat hypothalamus. *Biochemistry* 19: 2861-6.
- Stahl SM, Porreca F, Taylor CP, et al. (2013) The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? *Trends Pharmacol Sci* 34: 332-9.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. (2005) ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 434: 648-52.
- Staud R, Weyll EE, Riley JL, et al. (2014). Slow temporal summation of pain for assessment of central pain sensitivity and clinical pain of fibromyalgia patients. *PLoS One* 2: e89086.
- Stein C, Machelska H and Schafer M (2001) Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol* 60: 416-24.
- Stein C, Millan MJ and Herz A (1988) Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 445-51.

- Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, et al. (1989) Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 248: 1269-75.
- Steinberg J and Zeggini E (2016) Functional genomics in osteoarthritis: Past, present, and future. *J Orthop Res* 34: 1105-10.
- Stockton SD, Jr. and Devi LA (2014) An integrated quantitative proteomics and systems biology approach to explore synaptic protein profile changes during morphine exposure. *Neuropsychopharmacology* 39: 88-103.
- Stoller TJ and Shields D (1989) The role of paired basic amino acids in mediating proteolytic cleavage of prosomatostatin. Analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 264: 6922-8.
- Stroh T and Zupanc GK (1995) Somatostatin in the prepacemaker nucleus of weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*: evidence for a nonsynaptic function. *Brain Res* 674: 1-14.
- Su J, Sandor K, Skold K, et al. (2014) Identification and quantification of neuropeptides in naive mouse spinal cord using mass spectrometry reveals [des-Ser1]-cerebellin as a novel modulator of nociception. *J Neurochem* 130: 199-214.
- Su X, Liang AH and Urban MO. The effect of amitriptyline on ectopic discharge of primary afferent fibers in the L5 dorsal root in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 108: 1671-9.
- Szolcsanyi J, Helyes Z, Oroszi G, et al. (1998) Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 123: 936-42.
- Tabet JC and Rebuffat S (2003) [Nobel Prize 2002 for chemistry: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance]. *Med Sci (Paris)* 19: 865-72.
- Takano M and Matsuyama S (2014) Intracellular and nuclear bradykinin B2 receptors. *Eur J Pharmacol* 732: 169-72.
- Takano S, Uchida K, Inoue G, et al. (2017) Increase and regulation of synovial calcitonin gene-related peptide expression in patients with painful knee osteoarthritis. *J Pain Res* 10: 1099-104.

- Takasusuki T and Yaksh TL (2011) The effects of intrathecal and systemic gabapentin on spinal substance P release. *Anesth Analg* 112: 971-6.
- Talbot JD, Duncan GH and Bushnell MC (1989) Effects of diffuse noxious inhibitory controls (DNICs) on the sensory-discriminative dimension of pain perception. *Pain* 36: 231-8.
- Tanga FY, Nutile-McMenemy N and DeLeo JA (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5856-61.
- Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, et al. (2004) Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 14: 197-204.
- Taylor BK and McCarson KE (2004) Neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse dorsal horn increases with neuropathic pain. *J Pain* 5: 71-6.
- Tebbe JJ, Tebbe CG, Mronja S, et al. (2005) Central neuropeptide Y receptors are involved in 3rd ventricular ghrelin induced alteration of colonic transit time in conscious fed rats. *BMC Gastroenterol* 5: 5.
- Tenti S, Pascarelli NA, Cheleschi S, et al. (2016) The Emerging Role of Bradykinin in the Pathogenesis of Osteoarthritis and its Possible Clinical Implications. *Curr Rheumatol Rev* 12: 177-84.
- Tetreault P, Dansereau MA, Dore-Savard L, et al. (2011) Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav* 104: 495-502.
- Thakur M, Rahman W, Hobbs C, et al. (2012) Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One* 7: e33730.
- Thakur MS and Ragavan KV (2013) Biosensors in food processing. *J Food Sci Technol* 50: 625-41.
- Thijssen E, van Caam A and van der Kraan PM (2015) Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 54: 588-600.
- Todd AJ (2002) Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol* 87: 245-9.

- Todd AJ, Spike RC and Polgar E (1998) A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85: 459-73.
- Tracey I (2011) Can neuroimaging studies identify pain endophenotypes in humans? *Nat Rev Neurol* 7: 173-81.
- Tracey I and Mantyh PW (2007) The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 55: 377-91.
- Tran PB, Miller RE, Ishihara S, et al. (2017) Spinal microglial activation in a murine surgical model of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 25: 718-726.
- Treede RD, Meyer RA and Campbell JN (1998) Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol* 80: 1082-93.
- Troeberg L and Nagase H (2012) Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1824: 133-45.
- Tsai RY, Tai YH, Tzeng JI, et al. (2009) Ultra-low dose naloxone restores the antinociceptive effect of morphine in pertussis toxin-treated rats by reversing the coupling of mu-opioid receptors from Gs-protein to coupling to Gi-protein. *Neuroscience* 164: 435-43.
- Tsou CL, Peters W, Si Y, et al. (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117: 902-9.
- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, et al. (2011) TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain* 7: 30.
- Tuttle AH, Tohyama S, Ramsay T, et al. (2015) Increasing placebo responses over time in U.S. clinical trials of neuropathic pain. *Pain* 156: 2616-26.
- Uhelski ML, Bruce DJ, Seguela P, et al. (2017) In vivo optogenetic activation of Nav1.8+ cutaneous nociceptors and their responses to natural stimuli. *J Neurophysiol* 117: 2218-23.
- US VE and Gaddum JH (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72: 74-87.
- Vachon-Presseau E, Roy M, Martel MO, et al. (2013) The stress model of chronic pain: evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. *Brain* 136: 815-827.

- van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, et al. (1994) Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 71: 279-90.
- Van de Weerd HA, Bulthuis RJ, Bergman AF, et al. (2001) Validation of a new system for the automatic registration of behaviour in mice and rats. *Behav Processes* 53: 11-20.
- van den Berg WB, Joosten LA, Helsen M, et al. (1994) Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* 95: 237-43.
- van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, et al. (2010) Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med* 7: e1000245.
- van Lent PL, Blom AB, van der Kraan P, et al. (2004) Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 50: 103-11.
- Vellani V and Giacomoni C (2017) Gabapentin Inhibits Protein Kinase C Epsilon Translocation in Cultured Sensory Neurons with Additive Effects When Coapplied with Paracetamol (Acetaminophen). *ScientificWorldJournal* 2017: 3595903.
- Venesio T, Mulatero B and Fasolo A (1987) Coexistence of substance P and calcitonin gene-related peptide in the frog spinal cord. *Neurosci Lett* 80: 246-50.
- Vera-Portocarrero LP, Zhang ET, Ossipov MH, et al. (2006) Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. *Neuroscience* 140: 1311-20.
- Verdonk PC, Forsyth RG, Wang J, et al. (2005) Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 548-60.
- Vicuna L, Storchlic DE, Latremoliere A, et al. (2015) The serine protease inhibitor SerpinA3N attenuates neuropathic pain by inhibiting T cell-derived leukocyte elastase. *Nat Med* 21: 518-23.
- Vierboom MP, Breedveld E, Keehnen M, et al. (2017) Pain Relief in Nonhuman Primate Models of Arthritis. *Methods Mol Biol* 1559: 411-17.
- Vierck CJ, Hansson PT and Yeziarski RP (2008) Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain* 135: 7-10.

- Vierck CJ, Jr., Cannon RL, Fry G, et al. (1997) Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *J Neurophysiol* 78: 992-1002.
- Villanueva I, Gladem SK, Kessler J, et al. (2010) Dynamic loading stimulates chondrocyte biosynthesis when encapsulated in charged hydrogels prepared from poly(ethylene glycol) and chondroitin sulfate. *Matrix Biol* 29: 51-62.
- Vivancos GG, Verri WA, Jr., Cunha TM, et al. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* 37: 391-9.
- von Hehn CA, Baron R and Woolf CJ (2012) Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73: 638-52.
- Vonsy JL, Ghandehari J and Dickenson AH (2009) Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. *Eur J Pain* 13: 786-93.
- Vrinten DH and Hamers FF (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: 203-9.
- Wager TD, Atlas LY, Lindquist MA, et al. (2013) An fMRI-based neurologic signature of physical pain. *N Engl J Med* 368: 1388-97.
- Wall PD (1978) The gate control theory of pain mechanisms. A re-examination and re-statement. *Brain* 101: 1-18.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, et al. (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7: 103-11.
- Wallace MR, Naylor SL, Kluge-Beckerman B, et al. (1985) Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 753-8.
- Wallace VC, Blackbeard J, Segerdahl AR, et al. (2007) Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. *Brain* 130: 2688-702.
- Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, et al. (2007) Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 743-51.
- Walsh DA, McWilliams DF, Turley MJ, et al. (2010) Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1852-61.

- Walton MB, Cowderoy E, Lascelles D, et al. (2013) Evaluation of construct and criterion validity for the 'Liverpool Osteoarthritis in Dogs' (LOAD) clinical metrology instrument and comparison to two other instruments. *PLoS One* 8: e58125.
- Wang H, Kohno T, Amaya F, et al. (2005) Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 25: 7986-92.
- Wang H and Woolf CJ (2005) Pain TRPs. *Neuron* 46: 9-12.
- Wasserstein RL and Lazar NA (2016) The ASA (American Statistical Association)'s statement on p-values: Context, process, and purpose. *The Am Stat* 70: 129-133.
- Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, et al. (1999) Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7635-9.
- Way JC and Chalfie M (1989) The mec-3 gene of *Caenorhabditis elegans* requires its own product for maintained expression and is expressed in three neuronal cell types. *Genes Dev* 3: 1823-33.
- Wehling M (2011) Drug development in the light of translational science: shine or shade? *Drug Discov Today* 16: 1076-83.
- Weindl A and Sofroniew MV (1981) Relation of neuropeptides to mammalian circumventricular organs. *Adv Biochem Psychopharmacol* 28: 303-20.
- Welsh EM, Gettinby G and Nolan AM (1993) Comparison of a visual analogue scale and a numerical rating scale for assessment of lameness, using sheep as a model. *Am J Vet Res* 54: 976-83.
- Westerink B (1982) Correlation between high-performance liquid chromatography and automated fluorimetric methods for the determination of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in nervous tissue and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr* 233: 69-77.
- Wicher G, Larsson M, Fex Svenningsen A, et al. (2006) Low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin is expressed in oligodendrocytes in the mouse spinal cord white matter. *J Neurosci Res* 83: 864-73.
- Willis WD (1985) Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308: 253-70.
- Willis WD and Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14: 2-31.



- Wimalawansa SJ (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 17: 533-85.
- Wimmer T, Lorenz B and Stieger K (2016) Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. *Biosens Bioelectron* 86: 609-15.
- Woeber KA and Ingbar SH (1968) The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoadsorption. *J Clin Invest* 47: 1710-21.
- Woo CW and Wager TD (2015) Neuroimaging-based biomarker discovery and validation. *Pain* 156: 1379-81.
- Wood JN, Akopian AN, Baker M, et al. (2002) Sodium channels in primary sensory neurons: relationship to pain states. *Novartis Found Symp* 241: 159-68; discussion 68-72, 226-32.
- Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306: 686-8.
- Woolf CJ (1996) Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* 66: 105-8.
- Woolf CJ, American College of P and American Physiological S (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 140: 441-51.
- Woolf CJ and Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-9.
- Woolf CJ, Shortland P and Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355: 75-8.
- Wu G, Ringkamp M, Murinson BB, et al. (2002) Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 22: 7746-53.
- Wu WW, Wang G, Baek SJ, et al. (2006) Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 5: 651-8.
- Wu XN, Zhang T, Qian NS, et al. (2015) Antinociceptive effects of endomorphin-2: suppression of substance P release in the inflammatory pain model rat. *Neurochem Int* 82: 1-9.
- Xu N, Wu MZ, Deng XT, et al. (2016) Inhibition of YAP/TAZ Activity in Spinal Cord Suppresses Neuropathic Pain. *J Neurosci* 36: 10128-40.



- Xu Y, Zhang X, Pu S, et al. (2014) Circulating microRNA expression profile: a novel potential predictor for chronic nervous lesions. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 46: 942-9.
- Xu ZZ, Zhang L, Liu T, et al. (2010) Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med* 16: 592-7, 1p following 97.
- Yarnitsky D (2010) Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol* 23: 611-5.
- Yarnitsky D, Granot M, Nahman-Averbuch H, et al. (2012) Conditioned pain modulation predicts duloxetine efficacy in painful diabetic neuropathy. *Pain* 153: 1193-8.
- Yeh TT, Wen ZH, Lee HS, et al. (2008) Intra-articular injection of collagenase induced experimental osteoarthritis of the lumbar facet joint in rats. *Eur Spine J* 17: 734-42.
- Yu C, Chen WP and Wang XH (2011) MicroRNA in osteoarthritis. *J Int Med Res* 39: 1-9.
- Yu LC, Hansson P and Lundberg T (1994) The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRP8-37 increases the latency to withdrawal responses in rats. *Brain Res* 653: 223-30.
- Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, et al. (2001) The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 44: 1056-70.
- Zar JH (2009) *Biostatistical Analysis*, 5<sup>th</sup> Ed., ISBN-13: 9789332536678, Prentice Hall – Pearson / Upper Saddle River NJ, 756 pp.
- Zarpelon AC, Rodrigues FC, Lopes AH, et al. (2016) Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB J* 30: 54-65.
- Zelenka M, Schafers M and Sommer C (2005) Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 116: 257-63.
- Zestos AG and Kennedy RT (2017) Microdialysis Coupled with LC-MS/MS for In Vivo Neurochemical Monitoring. *AAPS J* 19: 1284-1293.
- Zhang RX, Ren K and Dubner R (2013) Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1308-15.
- Zhang X, Chen Y, Wang C, et al. (2007) Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9864-9.

- Zhang YK, Huang ZJ, Liu S, et al. (2013) WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J Clin Invest* 123: 2268–2286.
- Zhang Y, Wang YH, Zhang XH, et al. (2008) Proteomic analysis of differential proteins related to the neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion following its chronic compression in rats. *Exp Brain Res* 189: 199-209.
- Zhou X, Lin X, Xiong Y, et al. (2016) Chondroprotective effects of palmatine on osteoarthritis in vivo and in vitro: A possible mechanism of inhibiting the Wnt/beta-catenin and Hedgehog signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 34: 129-38.
- Zhuo M and Gebhart GF (1990) Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain* 42: 337-50.
- Zhuo M and Gebhart GF (1997) Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J Neurophysiol* 78: 746-58.
- Zubrzycka M and Janecka A (2000) Substance P: transmitter of nociception (Minireview). *Endocr Regul* 34: 195-201.
- Zupanc GK (1996) Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron* 27: 35-91.