

Université de Montréal

**Détection et validation de marqueurs épigénétiques
d'atteinte nociceptive dans l'arthrose sur modèle
expérimental murin**

par Katrine Ann Cristofanilli

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option pharmacologie

Avril 2019

© Katrine Ann Cristofanilli, 2019

Université de Montréal
Département de biomédecine, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Détection et validation de marqueurs épigénétiques d'atteinte nociceptive dans
l'arthrose sur modèle expérimental murin**

Présenté par

Katrine Ann Cristofanilli

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Daniel Pang

Président-rapporteur

Éric Troncy

Directeur de recherche

Alexandre Boyer

Codirecteur

Gustavo Zamberlam

Membre du jury

Résumé

L'arthrose est considérée comme étant la cause la plus prépondérante de douleur articulaire chronique, autant chez l'humain que chez l'animal de compagnie. Alors que la sensibilisation nociceptive y a été associée, les mécanismes pathologiques sous-jacents de cette maladie ne restent que partiellement élucidés. Récemment, l'induction chirurgicale d'arthrose chez le rat a permis de révéler la présence de changements dans l'expression fonctionnelle de la douleur ainsi que des modifications neurophysiologiques quantifiables. De fait, l'implication de mécanismes épigénétiques dans la physiopathologie de l'arthrose a été suggérée.

Ce projet avait comme objectif d'améliorer notre compréhension de la douleur arthrosique par la validation d'un panel de méthodes d'évaluation de la douleur dans un modèle d'arthrose induite chirurgicalement chez le rat. En plus des évaluations structurelles et fonctionnelles de la douleur ainsi que des analyses neuropeptidomiques, préalablement validées, une exploration épigénétique analysant par RT-qPCR l'expression différentielle de miARNs spinaux potentiellement liés à l'arthrose a été entreprise.

L'intervention chirurgicale a entraîné le développement de dommages structuraux conséquents et a permis de détecter la mise en place de processus de sensibilisation centrale à la douleur. De plus, une augmentation au niveau spinal de l'expression de miR-181b a été mise en évidence, et ce miARN serait notamment associé à la douleur arthrosique, en particulier au niveau du contrôle endogène de douleur.

En prenant en compte plusieurs déterminants de la douleur arthrosique, ce projet contribue à l'amélioration de la recherche translationnelle sur la douleur chronique. La pertinence de la neuro-épigénétique dans l'étude de la douleur arthrosique a également été mise en évidence dans cette étude.

Mots-clés : Douleur chronique, Arthrose, Modèle animal, Biomarqueurs, Épigénétique, Micro-ARN, Neuropeptides, Évaluations fonctionnelles

Abstract

Osteoarthritis (OA) is considered the most common cause of chronic joint pain in humans, but also in companion animal patients. Nociceptive sensitization has been extensively associated with the disease. However, the pathological mechanisms leading to the development of this degenerative joint disease remain only partially understood. In the past few years, surgical induction of OA in rats allowed us to characterize some modifications in functional pain behaviors and to quantify neurophysiological changes. Hence, it has now been suggested that epigenetic mechanisms could also take part in OA physiopathology.

The goal of this project was to validate a panel of different pain evaluation methods in a surgically-induced OA rat model with the objective of a better understanding of OA pain. To achieve this, previously validated structural and functional pain assessments were conducted, as well as neuropeptidomic analysis. To test the contribution of epigenetic modification in OA, differential expression of spinal miRNAs was validated by RT-qPCR.

The surgical intervention led to the progression of significant structural damages. Moreover, this model confirmed the central nociceptive sensitization development in the OA rats. Indeed, changes in functional behaviors and in neuropeptidomic expression were identified. These findings were interestingly accompanied by an enhanced expression of miR-181b, a micro-RNA previously linked to endogenous control of pain.

Multiple pain determinants were taken into account in this surgically-induced OA model; therefore, this study contributed to the advancement of knowledge in chronic pain translational research. This project highlights the relevance of neuro-epigenetics in OA pain studies.

Keywords : Chronic pain, Osteoarthritis, Animal model, Biomarkers, Epigenetics, Micro-RNA, Neuropeptides, Functional evaluations

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations.....	10
Remerciements.....	14
Introduction.....	15
Section 1 : Revue de littérature.....	18
1. L'arthrose chez les mammifères	18
1.1. L'articulation synoviale	18
1.1.1. Caractéristiques anatomiques.....	19
1.1.2. Caractéristiques physiologiques et biomécaniques.....	20
1.1.3. Innervation articulaire.....	23
1.2. Arthrose.....	24
1.2.1. Épidémiologie.....	24
1.2.2. Étiologie et facteurs de risques	25
1.2.3. Physiopathologie.....	25
1.3. La douleur	29
1.3.1. Organisation et physiologie de la nociception	29
Nociception et système nerveux périphérique	33
Nociception et système nerveux central	35
1.3.2. Définition et présentation de la douleur arthrosique.....	39
1.3.3. Physiopathologie de la douleur arthrosique.....	40
Nociception articulaire.....	40
Sensibilisation périphérique.....	41
Sensibilisation centrale	42
2. Modèles expérimentaux	44

2.1.	Caractéristiques recherchées d'un modèle animal d'arthrose.....	45
2.2.	Modèles animaux d'arthrose et méthodes d'induction	46
2.2.1.	Modèles d'arthrose spontanés.....	47
2.2.2.	Modèles induits.....	48
	Modèles chimiques	48
	Modèles chirurgicaux d'instabilité articulaire	50
3.	Mesures de douleur arthrosique	51
3.1.	Évaluations structurelles et histopathologiques	52
3.1.1.	Radiographie.....	52
3.1.2.	Imagerie par résonance magnétique.....	53
3.1.3.	Histopathologie.....	53
3.2.	Analyses fonctionnelles de douleur	54
3.2.1.	Évaluations comportementales	54
3.2.2.	Évaluations de la distribution pondérale du poids et de la démarche.....	56
3.2.3.	Tests sensoriels quantitatifs	58
	Stimulations thermiques – Hargreaves test.....	59
	Stimulations mécaniques tactiles – von Frey.....	59
	Réponse à la sommation temporelle mécanique.....	60
3.3.	Analyses de marqueurs physiologiques moléculaires.....	61
3.3.1.	Substance P	62
3.3.2.	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> (CGRP)	63
3.3.3.	Bradykinine.....	64
3.3.4.	Somatostatine.....	64
4.	Épigénétique et la douleur chronique	66
4.1.	Micro-ARNs	66
4.1.1.	Description et biogenèse des micro-ARNs.....	67
4.1.2.	Implications physiologiques et pathophysiologiques des micro-ARNs	69
4.1.3.	Douleur arthrosique et micro-ARNs.....	70
4.1.4.	Analyse et détection de micro-ARNs	75
4.2.	Autres mécanismes épigénétiques potentiels de la douleur chronique.....	76
Section 2 : Description du projet de maîtrise.....		79

1. Problématique	79
2. Objectifs spécifiques.....	79
3. Hypothèse de recherche	81
Section 3 : Article	82
Section 4 : Discussion générale	118
1. Modèle de recherche translationnelle	118
2. Validation d'un panel de méthodes d'évaluation de la douleur arthrosique chez le rongeur	121
2.1. Évaluations fonctionnelles de la douleur	122
2.1.1. Évaluation de la distribution pondérale du poids : <i>Static Weight Bearing (SWB)</i>	123
2.1.2. Test sensoriel quantitatif statique : Stimulations mécaniques tactiles – Esthésiomètre <i>von Frey</i>	124
2.1.3. Test sensoriel quantitatif dynamique : <i>Response to mechanical temporal summation (RMTS)</i>	125
2.2. Analyses moléculaires	126
2.2.1. Analyse de neuropeptides spinaux.....	127
Substance P et CGRP.....	128
Bradykinine.....	129
Somatostatine.....	130
2.2.2. Analyse de micro-ARNs spinaux.....	131
MiR-181b.....	132
2.3. Analyses macroscopiques et histologiques.....	135
3. Limites de l'étude	137
3.1. Puissance statistique.....	138
3.2. Planification et durée de l'étude	139
3.3. Protocole d'exercice.....	140
Section 5 : Conclusion	142
Bibliographie.....	144

Liste des tableaux

Article scientifique :

Table 1. Fold change (OA/Naïve) in expression of selected miRNAs for RT-qPCR screening in spinal cord 56 days after surgery and regular exercise 110

Table 2. Macroscopic assessment of cartilage lesions and histological modified Mankin score (mMs) in percentage (%) of cartilage alterations of the tibial and femoral (medial & lateral) right stifle at sacrifice (D56)..... 111

Liste des figures

Figure 1. Exemple d'une articulation synoviale (épaule) chez la souris.	18
Figure 2. Changements structuraux et voies de signalisation d'une articulation normale (A) et arthrosique (B).	28
Figure 3. Schéma général de voies nociceptives de la périphérie au cerveau.	32
Figure 4. Représentation simplifiée de la transmission à la synapse entre les neurones de premier et second ordre.	38
Figure 5. Biogenèse des miARNs.	69

Article scientifique :

Figure 1. Temporal evolution of static weight bearing (SWB) of ipsilateral (right) hind limb and temporal evolution of SWB asymmetry index in the osteoarthritis (OA) and the Naïve rat groups.	104
Figure 2. Temporal evolution of the paw withdrawal threshold (PWT) of ipsilateral (right) hind paw and static quantitative sensory testing (QST) asymmetry index in the osteoarthritis (OA) and the Naïve rat groups.	106
Figure 3. Evolution in time of response to mechanical temporal summation (RMTS) as number of stimuli required to induce a response in the Naïve and OA groups.	108
Figure 4. Spinal neuropeptides concentration mean (fmol/mg) \pm standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (SST) at day (D) 56 post induction of osteoarthritis (OA) by CCLT-DMM surgery and regular exercise.	109

Liste des sigles et abréviations

AGO	Protéine Argonaute – <i>ArGOnaute protein</i>
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propioniate – <i>α-Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid</i>
ARN	Acide RiboNucléique – <i>ribonucleic acid</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotropic Factor</i>
BK	BradyKinine – <i>BradyKinin</i>
CaMKII γ	protéine kinase II Ca ²⁺ /calmoduline dépendante de type gamma (γ) – <i>Ca²⁺/calModuline-dependent protein Kinase type II gamma (γ)</i>
CCLT	transsection du ligament croisé crânial – <i>Cranial Cruciate Ligament Transection</i>
CGRP	peptide relié au gène de la calcitonine – <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
COX-2	enzyme cyclo-oxygénase 2 – <i>Cyclo-Oxygenase enzyme 2</i>
DMM	Déstabilisation du Ménisque Médial – <i>Destabilisation of the Medial Meniscus</i>
DWB	distribution pondérale du poids dynamique – <i>Dynamic Weight Bearing</i>
GABA	acide gamma-aminobutyrique – <i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
IRM	imagerie par résonance magnétique – <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
ISAP	association internationale pour l'étude de la douleur – <i>International Association for the Study of Pain</i>
JSW	espace articulaire – <i>Joint Space Width</i>
KWB	distribution pondérale du poids cinétique – <i>Kinetic Weight Bearing</i>
LABORAS	système d'enregistrement et d'analyse d'observations comportementales d'animaux de laboratoire – <i>Laboratory Animal Behavior Observation Registration and Analysis System</i>
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>

MIA	Monosodium IodoAcétate – <i>Monosodium IodoAcetate</i>
miARN	Micro Acide RiboNucléique – <i>micro ribonucleic acid</i>
ml	millilitre – <i>milliliter</i>
MMP	métalloprotéinase matricielle – <i>Matrix MetalloProteinase</i>
m/s	mètres par seconde – <i>meters per second</i>
NK1	NeuroKinine 1 – <i>NeuroKinin 1</i>
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate – <i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
NGF	facteur de croissance neuronal – <i>Neuronal Growth Factor</i>
OARSI	société internationale de la recherche sur l’arthrose – <i>OsteoArthritis Research Society International</i>
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymérase - <i>Poly (ADP-Ribose) Polymerase</i>
PEAP	paradigme du comportement d’échappement/évitement – <i>Place Escape/Avoidance Paradigm</i>
qPCR	réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel – <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
QST	test sensoriel quantitatif – <i>Quantitative Sensory Test</i>
RGS	échelle de grimace du rat – <i>Rat Grimace Scale</i>
RISC	complexe de silençage induit par l’ARN – <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNase-III	ribonucléase de type III – <i>type III RiboNuclease</i>
SNL	ligation du nerf sciatique – <i>Sciatic Nerve Ligation</i>
SP	substance P – <i>Substance P</i>
SST	<i>SomatoStaTin</i>
STT	SomaTosTatine
SWB	distribution pondérale du poids statique – <i>Static Weight Bearing</i>

TNF- α	facteur de nécrose tumoral-alpha – <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloide 1</i>
μm	micromètre – <i>micrometer</i>

À ma chienne d'exception Zuma. Ta souffrance, mais surtout ta résilience face à l'arthrose m'ont motivée à chaque instant de ce projet.

Remerciements

Aux professeurs Éric Troncy et Alexandre Boyer, respectivement mon directeur et mon co-directeur de recherche. La collaboration de ces deux personnalités bien différentes, mais complémentaires a permis la réalisation d'un projet dont je suis très fière. Votre confiance, votre soutien et surtout votre passion m'ont amenée à me surpasser continuellement. Vous m'avez permis d'apprendre énormément sur plusieurs sujets et je vous en remercie grandement !

À docteur Colombe Otis, un énorme merci pour ton support, tu as toujours été disponible pour me guider et me conseiller. Tu as été un exemple de persévérance et de rigueur pour moi et j'ai été chanceuse d'avoir pu te côtoyer.

Émilie Bouet, quelle chance j'ai eue d'avoir croisé ton chemin ! J'ai sincèrement apprécié travailler avec toi et ton aide m'a permis d'avancer énormément dans ce projet. Ton passage au Québec ne sera pas oublié et je te souhaite un immense succès dans le futur.

À l'équipe du laboratoire du professeur Carl Gagnon et particulièrement à docteur Chantale Provost, pour leur grande générosité en termes d'expertise et de temps, leur support a été essentiel dans cette aventure de séquençage des miARNs.

À Marianne Tardif et Dalia Aoudj, pour leur contribution au projet ; leur dévouement, patience et enthousiasme ont été essentiels.

Aux docteurs Jean-Pierre Pelletier et Johanne Martel-Pelletier, ainsi qu'à toute l'équipe d'Arthrolab, merci de nous avoir accueillis et d'avoir grandement contribué au bien-être de nos rats.

Aux professeurs Bertrand Lussier et Francis Beaudry, pour la grande expertise de chacun dans leur domaine respectif, pour leur contribution au projet et pour tous leurs petits conseils.

À tous les autres étudiants et chercheurs que j'ai eu la chance de rencontrer et côtoyer au cours de cette aventure, vous m'avez accueilli dans ce monde des cycles supérieurs avec tant de gentillesse et de générosité, vous êtes inspirants !

À mon conjoint et meilleur allié Alexis, je ne pourrai jamais te remercier assez pour ton support, tes encouragements et tes conseils. Tu m'as appris à croire en moi et tu m'as poussé à persévérer toujours, à travers les hauts et les bas de cette aventure.

À ma famille et mes amis, vos encouragements et votre écoute m'ont toujours fait chaud au cœur. Merci de vous être montrés intéressés malgré la complexité de mon projet.

Introduction

La notion de douleur peut poser problème lorsque vient le temps de la définir de manière concise et exacte (Klinck & Troncy, 2016). Ceci est notamment dû à la nature subjective de l'expérience chez des individus différents (Gold & Gebhart, 2010; Klinck & Troncy, 2016). Or, le concept de douleur apparaît encore plus flou lorsqu'elle devient chronique. En effet, la douleur chronique ne correspond pas simplement à la continuité d'une douleur aiguë, mais plutôt à une douleur mal adaptée, sans utilité biologique, représentant de surcroît un stress chronique accompagné de quantité de changements pathologiques dommageables. Malheureusement, pour le moment, il y a peu d'espoir lorsque vient le temps de traiter la douleur chronique. De fait, bien souvent, aucune lésion/blessure n'est visible (traçable), alors que la douleur elle-même devient pathologique. Dans d'autres occasions, il peut s'avérer que la douleur soit associée à une maladie persistante, comme c'est le cas pour l'arthrose (Klinck & Troncy, 2016). Il existe une panoplie de maladies associées à la douleur chronique et chacune constitue un domaine d'étude en soi. Bien que plusieurs mécanismes physiopathologiques menant à l'établissement de la douleur chronique soient possiblement partagés par ces maladies, chacune présente un processus initial de mise en place propre à elle-même (Klinck et al., 2017).

L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative dans laquelle la douleur chronique représente le symptôme principal (Arendt-Nielsen, 2017; Mease, Hanna, Frakes, & Altman, 2011; Salaffi, Ciapetti, & Carotti, 2014). Cette maladie survenant tant chez l'Homme que chez l'animal est d'ailleurs le sujet de plusieurs études s'intéressant à la douleur chronique. Par ailleurs, chez l'humain, la prévalence grandissante de cette maladie associée au vieillissement et à l'obésité constitue une problématique socio-économique importante dans les pays développés (Johnson & Hunter, 2014). De façon intéressante, le portrait de la prévalence et de la présentation clinique de l'arthrose est comparable chez nos animaux de compagnie (Brown, 2017; Klinck et al., 2017).

L'arthrose présente d'importantes problématiques tant au niveau de la compréhension de son étiologie et de sa progression, qu'au sujet de ses avenues thérapeutiques (Arendt-Nielsen, 2017; Salaffi et al., 2014). En effet, alors que les causes de la mise en place de la pathologie seraient multifactorielles (Fu, Robbins, & McDougall, 2018), les processus

physiopathologiques impliqueraient une multitude de mécanismes incluant diverses composantes des systèmes inflammatoires et immunitaires (Fu et al., 2018; Salaffi et al., 2014). Du coup, l'arthrose entraîne non seulement des changements majeurs de la structure articulaire, mais aussi des modifications en ce qui a trait aux mécanismes de la perception de la douleur, le tout résultant en une sensibilisation à la nociception (Fu et al., 2018). Récemment, l'épigénétique, soit les mécanismes de régulation de l'expression génique n'impliquant pas la séquence d'ADN, a été suggérée comme étant impliquée dans l'altération de la régulation de l'expression protéique associée à ces changements (Li et al., 2016; Yu, Chen, & Wang, 2011; Yu et al., 2015).

Dans un autre ordre d'idées, la complexité de tous ces processus contribue sans aucun doute à la difficulté éprouvée dans la compréhension de la pathologie ainsi que dans la recherche de cibles thérapeutiques. Par ailleurs, un enjeu d'autant plus important survient dans la recherche du domaine biomédical tout particulièrement en ce qui concerne la douleur chronique. En effet, il arrive trop souvent que des traitements expérimentaux démontrant des résultats encourageants en phase préclinique soient voués à l'échec lorsqu'ils atteignent la phase d'essai clinique, limitant alors considérablement le développement de drogues analgésiques et de traitements (Klinck et al., 2017; Mogil, 2017). Cette « crise translationnelle » remet ainsi en question la validité des modèles expérimentaux animaux pour l'étude de la douleur, et évoque par le fait même un important besoin quant au développement de modèles plus fiables, ainsi que la nécessité d'améliorer les méthodes d'analyse de la progression des maladies et d'évaluation de la douleur (Klinck et al., 2017; Lascelles, Brown, Maixner, & Mogil, 2018; Mogil, 2017).

Ce projet de maîtrise avait ainsi pour objectif de caractériser les changements neuro-épigénétiques dans un modèle d'arthrose chirurgicale chez le rat. Le modèle en question a récemment démontré la capacité à reproduire fidèlement la progression de la pathologie, en engendrant notamment des changements neuropeptidomiques et fonctionnels quantifiables associés à l'arthrose (Gervais et al., 2019). Ainsi, une revue de la physiopathologie de l'arthrose sous l'angle de l'animal de compagnie sera d'abord présentée, alors que les plus récentes connaissances au sujet des caractéristiques anatomiques et physiologiques de l'articulation synoviale ainsi que du système nociceptif seront abordées. Par la suite, une présentation de différents modèles animaux de douleur arthrosique, ainsi que de diverses mesures de la douleur

utilisées en recherche seront développés. Cette revue de littérature sera suivie par un article scientifique incluant le protocole et les résultats du projet de recherche. Enfin, une discussion abordant les informations et les nouvelles connaissances émanant de ce projet sera présentée, de même qu'une réflexion sur les limites de l'étude.

Section 1 : Revue de littérature

1. L'arthrose chez les mammifères

1.1. L'articulation synoviale

L'arthrose entraîne plusieurs atteintes pathologiques au niveau articulaire chez les patients vétérinaires. Plus spécifiquement, ce sont les articulations synoviales qui seront affectées au cours de la progression de cette maladie dégénérative. De fait, un rappel de l'anatomie (Figure 1, p.18) ainsi que des processus physiologiques et biomécaniques des articulations synoviales chez les mammifères domestiques sains, devra être fait. Étant donné que la douleur est au cœur du projet de recherche présenté ici, les composantes du système nerveux procurant l'innervation aux articulations synoviales seront aussi abordées.

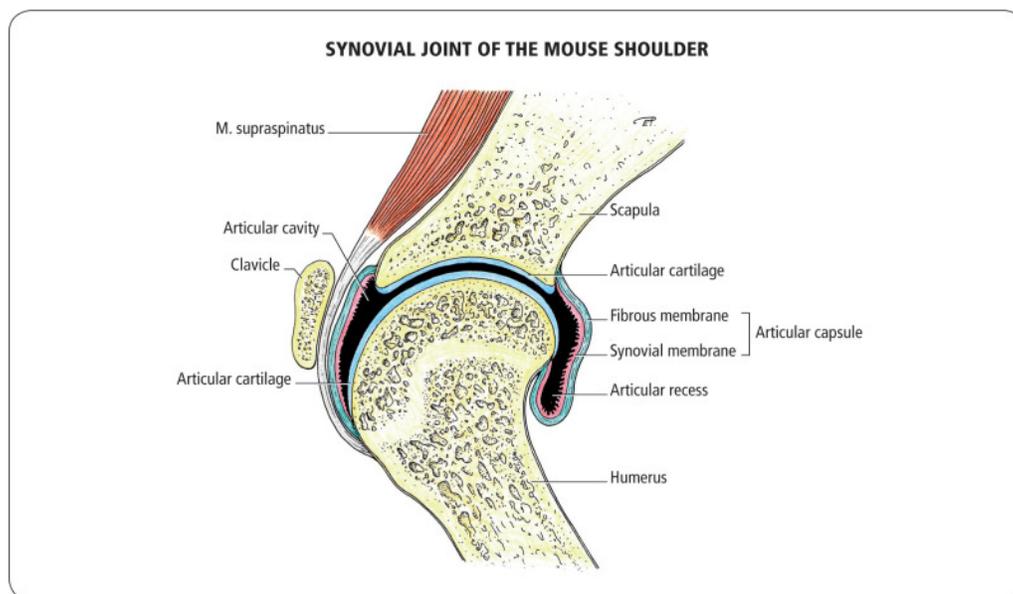


Figure 1. Exemple d'une articulation synoviale (épaule) chez la souris.

L'articulation synoviale permet généralement l'interconnexion des os, soit la scapula et l'humérus sur le schéma présenté ici. Ce type d'articulation est caractérisée par une cavité articulaire (ou synoviale) remplie de fluide. Cette cavité est définie par une capsule articulaire composée de la membrane synoviale et de la membrane fibreuse, s'attachant au pourtour de l'articulation. L'extrémité de chacun des os (os sous-chondral) est par ailleurs recouverte de cartilage articulaire. De plus, plusieurs tendons musculaires et ligaments s'attachent normalement aux structures articulaires. Figure tirée de (Navarro, Ruberte, Carretero, & Lopez-Luppo, 2017).

1.1.1. Caractéristiques anatomiques

L'articulation synoviale est l'articulation la plus fréquemment retrouvée chez les Mammifères (Navarro et al., 2017; Tarafder & Lee, 2016) et peu importe l'espèce les composantes anatomiques de ce type d'articulation sont les mêmes. Ainsi, ses propriétés physiologiques et biomécaniques sont similaires autant chez l'Homme que chez les petits rongeurs et animaux domestiques. L'articulation synoviale, comme tout autre type d'articulation, permet l'interconnexion des os. Toutefois, elle possède la particularité de permettre en outre une importante propriété de mouvements au squelette (Sjaastad, Sand, & Hove, 2010; Tarafder & Lee, 2016). La présence d'une cavité remplie de fluide entre les os impliqués dans l'articulation est une caractéristique anatomique de l'articulation synoviale, et permet d'ailleurs l'exécution de mouvements d'amplitude relativement importante tout en limitant la friction entre les os (Sjaastad et al., 2010). Dans une articulation synoviale en santé, plusieurs composantes contribuent au soutien de l'articulation, dont l'os sous-chondral, la membrane synoviale, le cartilage articulaire et les ménisques (pour la majorité des articulations synoviales) (Figure 2 panneau A, p.28) (Kuyinu, Narayanan, Nair, & Laurencin, 2016).

La cavité articulaire contenant le fluide synovial est tapissée par une mince couche de tissu conjonctif, nommée membrane synoviale. Cette membrane délimite les structures de l'articulation en prenant notamment son attache au pourtour des surfaces articulaires, celles-ci étant à leur tour recouvertes d'une mince couche de cartilage articulaire (Johnston, 1997; Singh, 2010). La membrane synoviale comporte entre autres des cellules spécialisées, les synoviocytes, qui participent à la production du liquide synovial ainsi qu'à la sécrétion de composantes dérivées du plasma sanguin (Hui, McCarty, Masuda, Firestein, & Sah, 2012; Johnston, 1997; Singh, 2010). Le liquide synovial ou synovie, est un fluide permettant d'une part la lubrification des surfaces articulaires et procurant d'autre part un apport nutritif au cartilage et autres tissus intra-articulaires, dont la membrane elle-même (Hui et al., 2012; Pasquini, Spurgeon, & Pasquini, 2007a; Singh, 2010). Aussi, la majeure partie de la membrane synoviale est renforcée par une capsule articulaire fibreuse qui s'attache au périoste ou près des marges du cartilage articulaire (Pasquini et al., 2007a; Singh, 2010). Cette vaste capsule permet ainsi d'unir les diverses composantes articulaires (Singh, 2010). Afin de solidifier le tout, des ligaments sont généralement placés stratégiquement autour de la capsule articulaire. Ceux-ci joignent alors les

os retrouvés de part et d'autre de l'articulation restreignant alors l'amplitude ainsi que la direction des mouvements articulaires. Enfin, il arrive parfois que les surfaces articulaires aient naturellement une cohésion imparfaite, notamment pour l'articulation du genou, et du coup, certaines structures supplémentaires sont nécessaires pour permettre un meilleur assemblage des composantes de l'articulation (Singh, 2010). Ainsi, les ménisques et disques sont des structures composées de cartilage hyalin, de fibrocartilage et de tissus fibreux en proportions variables, qui complètent la structure osseuse permettant alors de maintenir un bon alignement articulaire (Barone, 2000; Singh, 2010).

1.1.2. Caractéristiques physiologiques et biomécaniques

Tel que mentionné précédemment, les articulations permettent le mouvement via l'interconnexion des os. Ainsi, les os qui composent les surfaces articulaires sont essentiels au bon fonctionnement de l'articulation synoviale. Ceux-ci sont sujets aux forces gravitationnelles et transmettent les forces de propulsion. Par ailleurs, ils supportent le poids corporel et subissent des forces de compression et de traction. Ayant un rôle de support mécanique important, le squelette est d'autant plus soumis à des forces d'étirement et de flexion provenant des muscles et des tendons. Outre le rôle de levier permettant le mouvement ou encore ses rôles d'échafaudage et d'ancrage pour les tissus mous, les os permettent le stockage de minéraux, principalement le calcium et le phosphate. De plus, la moelle osseuse retrouvée dans la cavité des os longs constitue une réserve de gras chez les mammifères et représente également le principal lieu de production des cellules sanguines. Par ailleurs, les os sont constitués de composantes organiques (40%) et inorganiques (60%). Les fibres de collagène sont les principales composantes organiques des os. Ces fibres déposées au niveau extracellulaire procurent aux os leur résistance aux forces de traction, d'étirement et de flexion. En ce qui concerne les forces de compression, elles sont plutôt contrées par les cristaux de calcium et phosphate qui constituent la majeure partie des composantes inorganiques du squelette. Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse et de la sécrétion des composantes organiques nécessaires pour la formation de l'os, mais contribuent aussi à sa minéralisation. Avec le temps, les ostéoblastes sont éventuellement piégés dans l'os minéralisé et deviennent moins actifs, maintenant toutefois l'os vivant. Une fois matures, ces cellules sont nommées ostéocytes et restent importantes pour le transport du calcium et du phosphate au fluide

extracellulaire. Afin d'assurer la réparation de l'os en cas de dommage, des cellules souches ou cellules ostéoprogénitrices, sont toujours présentes au niveau des surfaces osseuses et peuvent se différencier en ostéoblastes au besoin. Quant à eux, les ostéoclastes sont un autre type cellulaire jouant un rôle important dans la physiologie osseuse. Ces cellules phagocytaires dérivées des macrophages permettent la résorption osseuse généralement à un niveau local. À eux deux, les ostéoblastes et ostéoclastes sont ainsi nécessaires tout au long de la vie d'un individu afin d'assurer un remodelage osseux approprié en réponse aux divers stress mécaniques pouvant survenir (Sjaastad et al., 2010).

L'unité fonctionnelle de base de l'os se nomme « ostéon » ou « système de Havers », et comprend un arrangement de lamelles concentriques d'ostéocytes autour d'un canal central, soit le canal de Havers. Ces canaux centraux contiennent un ou plusieurs vaisseaux sanguins parcourant parallèlement la surface osseuse. En fait, les ostéoblastes qui bordent ces canaux initient le processus d'ossification qui entraîne la formation des cylindres concentriques de tissus osseux dans lesquels les ostéocytes sont incorporés. Il est à noter que les ostéoblastes sont également retrouvés au niveau de la surface externe de l'os. Ainsi, d'une part, la forme des os longs est assurée par de l'os compact solide composé d'ostéons qui forment le cortex d'apparence majoritairement lisse, autour d'une cavité médullaire centrale où l'os est plus rugueux. D'autre part, les extrémités de ces os sont occupées par de l'os spongieux correspondant à un treillis tridimensionnel d'os d'épaisseur variable. Quant à elle, la moelle osseuse se retrouve au niveau de la cavité médullaire de même que dans l'espace interstitiel de l'os spongieux. Mis à part les régions coiffées de cartilage articulaire, la surface externe de l'os est recouverte d'une membrane fibreuse nommée périoste (Singh, 2010). Au niveau des surfaces articulaires, c'est l'os sous-chondral qui est retrouvé directement sous le cartilage articulaire (Sjaastad et al., 2010).

Le cartilage articulaire ou hyalin est un tissu plus lisse et mou que l'os, qui permet de réduire efficacement la friction, protégeant ainsi les extrémités des os en contact (Sjaastad et al., 2010). La structure du cartilage n'est pas uniforme, celle-ci est calcifiée au niveau des couches profondes permettant un attachement ferme au cortex de l'os, puis devient plus fibreuse au niveau périphérique où elle se confond au périoste et à la capsule articulaire (Singh, 2010). Le cartilage est principalement composé de collagène de type II et de protéoglycanes, et 65-80%

de sa masse se constitue de liquide. Les chondrocytes sont les seules cellules du cartilage; celles-ci permettent la synthèse et le maintien de l'environnement extracellulaire du cartilage. Le remodelage du cartilage se fait de manière minimale en temps normal, alors que les chondrocytes ne synthétisent qu'au besoin les composantes de la matrice cartilagineuse ainsi que des enzymes de dégradation. Le réseau de fibres de collagène combiné aux protéoglycanes de nature très hydrophile, procure au cartilage la capacité d'absorber les stress mécaniques et d'y répondre (Xia et al., 2014). Évidemment, si la structure de collagène et protéoglycanes est endommagée des changements morphologiques surviennent. Le cartilage articulaire peut s'adapter jusqu'à un certain point, mais un stress excessif qui endommage fortement la matrice peut éventuellement modifier le métabolisme des chondrocytes et altérer leur fonctionnement (Johnston, 1997). Il est de plus important de noter que le cartilage articulaire est une structure non vascularisée et non innervée (Kay, Richardson, & Forsyth, 2011; Schumacher, Block, Schmid, Aydelotte, & Kuettner, 1994; Singh, 2010; Sjaastad et al., 2010). Ceci peut d'ailleurs expliquer pourquoi les lésions articulaires sont parfois déjà bien importantes au moment où un individu ne fait que commencer à présenter des signes d'atteinte articulaire (Singh, 2010; Sjaastad et al., 2010). Les besoins en oxygène et en nutriments aux cellules du cartilage et des composantes intra-articulaires sont alors assurés via d'autres sources par diffusion, d'où l'importance de la forte teneur en fluide composant le cartilage (Schumacher et al., 1994; Sjaastad et al., 2010; Xia et al., 2014).

Évidemment, le liquide synovial est une source de nutriments importante, mais permet également une lubrification des surfaces articulaires, réduisant ainsi la friction entre les os. En effet, seul un mince film de ce liquide visqueux sépare les surfaces articulaires, permettant ainsi d'éviter la séparation des surfaces lors de mouvements rapides grâce aux forces de cohésion (Pasquini et al., 2007a; Schumacher et al., 1994; Sjaastad et al., 2010). L'une des composantes majeures du liquide synovial sont les protéines dérivées du plasma, celles-ci comprennent principalement l'albumine, diverses globulines et quelques plus grosses protéines comme le fibrinogène (Hui et al., 2012; Levick, 1981). Autrement, ce fluide contient certaines macromolécules essentielles à sa propriété de lubrification articulaire (Hui et al., 2012; Ogston & Stainer, 1953; Swann, Slayter, & Silver, 1981). En termes de nutriments, le liquide synovial contient certains électrolytes et des petites molécules comme, du glucose, du lactate ou encore

de l'oxygène, et celles-ci sont en proportion semblables à celles retrouvées dans le plasma (Hui et al., 2012; Johnston, 1997). Les cellules responsables de la sécrétion du liquide synovial qui se retrouvent dans la mince membrane synoviale se différencient en deux types de synoviocytes. Les cellules du type A s'apparentent aux macrophages, ayant un rôle dans la dégradation de débris ainsi que dans le traitement d'antigènes au niveau intra-articulaire. Les cellules du groupe B, ont également une fonction de dégradation *via* la sécrétion d'enzymes, mais, sont aussi responsables de la production d'acide hyaluronique qui contribue à la lubrification de l'articulation. De plus, les deux types de synoviocytes peuvent également produire des cytokines et autres médiateurs (Johnston, 1997). Enfin, la membrane synoviale de même que la couche la plus interne de la capsule articulaire préviennent de manière sélective l'entrée dans la cavité articulaire de grosses molécules, telles des protéines (Johnston, 1997). Au travers de ces couches tapissant la capsule articulaire fibreuse, on retrouve néanmoins une riche vascularisation et innervation (Pasquini et al., 2007a). La vascularisation synoviale à ce niveau est importante, car elle procure la possibilité de régénérer les petites molécules présentes dans la synovie. Lors de dommages à la membrane synoviale ou au cartilage, des médiateurs inflammatoires, notamment des prostaglandines et cytokines, sont d'autant plus relâchés dans le liquide synovial. Cependant, ceci peut entraîner une augmentation de la perméabilité de la vascularisation synoviale et mener à un déséquilibre oncotique, par l'entrée de protéines. Or, l'équilibre oncotique du liquide synovial est important puisqu'il permet de contrôler le volume de fluide (Johnston, 1997).

1.1.3. Innervation articulaire

L'innervation des structures articulaires se compose globalement de fibres nerveuses de type mécanosensorielles, nociceptives et sympathiques. Les terminaisons libres en périphérie des divers neurones qui composent ces fibres se situent dans la majorité des composantes de l'articulation, incluant l'os sous-chondral, le périoste, les ligaments périarticulaires, la capsule articulaire fibreuse, le tissu adipeux, les ménisques, les muscles périarticulaires et la membrane synoviale, alors qu'en condition normale le cartilage est non vascularisé et non innervé (Arendt-Nielsen, 2017; Singh, 2010). Les terminaisons nerveuses au niveau articulaire peuvent être proprioceptives ou sensibles, et enregistrent ainsi des informations qui concernent le

positionnement de l'articulation ou encore des signaux de douleur. Afin de permettre la motricité, les muscles sont d'autant plus innervés par diverses fibres motrices (Singh, 2010).

1.2. Arthrose

L'association *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) a proposé une définition standardisée de l'arthrose visant à inclure les multiples phénotypes de cette pathologie. Ainsi, l'arthrose serait une maladie des articulations mobiles caractérisée par un stress cellulaire et la dégradation de la matrice extracellulaire préalablement initiés par des lésions micro- et macroscopiques. Ces lésions activeraient des réponses de réparation déficientes qui impliquent des voies de signalisation pro-inflammatoires et du système immunitaire inné. La maladie se manifesterait donc d'abord par un dérèglement moléculaire (métabolisme anormal des tissus articulaire), suivi par des altérations anatomiques et/ou physiologiques qui culminent enfin par l'établissement de l'arthrose (Kraus, Blanco, Englund, Karsdal, & Lohmander, 2015).

1.2.1. Épidémiologie

Les pathologies rhumatologiques ou musculo-squelettiques comprennent plus de 150 maladies et syndromes associés à de la douleur. Parmi celles-ci figure l'arthrose, soit une maladie dégénérative de la structure et de la fonction de l'ensemble de l'articulation synoviale (Fusco, Skaper, Coaccioli, Varrassi, & Paladini, 2017). Étant la maladie articulaire la plus fréquente, elle présente une forte prévalence tant chez l'humain que chez l'animal de compagnie ((COFER), 2015; Brown, 2017). Chez l'humain, c'est environ 25% des individus adultes qui seront affectés au cours de leur vie par la pathologie et cette prévalence démontre une augmentation importante depuis les dernières années (Chen et al., 2017; Hunter, Schofield, & Callander, 2014). Du côté vétérinaire, c'est 20-30% de la population canine adulte qui développera spontanément la maladie (Brown, 2017; Lascelles et al., 2018). Par ailleurs, chez le chat, c'est plus de 80% de la population gériatrique qui démontrerait des signes d'arthrose à la radiographie, alors qu'environ la moitié de ceux-ci présenteraient des signes cliniques (Beale, 2005; Brown, 2017; Lascelles et al., 2018). La douleur, la raideur articulaire et la perte de mobilité sont des symptômes importants de l'arthrose (Beale, 2005; Brown, 2017; Fu et al., 2018). Chez l'humain, d'autres complications s'ajoutent à la douleur, tels des symptômes de

dépression et des troubles du sommeil amplifiant de manière non négligeable l'atteinte à la qualité de vie des patients (Felson, 2009). Ceux-ci pourraient évidemment être transposables à l'animal de compagnie, ce dernier devant s'adapter à un niveau d'activité diminuée ainsi qu'à un mode de vie plus sédentaire (Beale, 2005).

1.2.2. Étiologie et facteurs de risques

L'étiologie de la maladie est multifactorielle, plusieurs facteurs tant génétiques, bio-cellulaires, mécaniques, qu'environnementaux, interagissent ensemble pour éventuellement mener au stade final commun de l'arthrose (Chen et al., 2017; Neogi & Zhang, 2013). Il a été démontré tant chez l'humain que chez l'animal de compagnie que certains facteurs de risques associés à l'initiation de la maladie exercent une pression au niveau physiologique de l'individu lui-même, par exemple, l'âge, le surpoids et surtout l'obésité, alors que d'autres facteurs agissent plutôt au niveau articulaire, tels divers facteurs biomécaniques (blessures, occupations et activité physique) ((COFER), 2015; Brown, 2017; Felson, Anderson, Naimark, Walker, & Meenan, 1988; Johnson & Hunter, 2014; Little & Zaki, 2012). Ainsi, divers processus permettraient la progression de cette maladie, reflétant par le fait même les phénotypes variables observés entre les individus au cours du développement de l'arthrose (Neogi & Zhang, 2013). En effet, une grande hétérogénéité dans la présentation de la pathologie est constatée, tant au niveau moléculaire qu'au niveau des lésions observées, mais aussi dans la perception de la douleur (Eitner, Hofmann, & Schaible, 2017).

Il faut d'autant plus considérer le fait que la douleur articulaire ressentie dans l'arthrose, soit le symptôme premier de la maladie, est d'autant plus complexe (Mease et al., 2011; Salaffi et al., 2014). Ceci dit, l'étiologie de la douleur arthrosique est également multifactorielle et afin de mieux la caractériser, on la considère généralement chez l'humain dans un complexe biopsychosocial. En effet, il a été suggéré que la génétique, l'atteinte articulaire et les mécanismes neurobiologiques agissent sur la perception de la douleur en combinaison avec des facteurs psychologiques, psychosociaux et/ou autres (Neogi, 2013).

1.2.3. Physiopathologie

La destruction progressive du cartilage a longtemps été étiquetée comme étant la problématique principale de la physiopathologie de l'arthrose. Or, dans les dernières années, il

a été établi que l'ensemble de l'articulation est impliqué dans l'établissement de la pathologie (Eitner et al., 2017; Fusco et al., 2017; Goldring, 2009). En fait, l'érosion que subit le cartilage en réponse aux divers facteurs de risque entraîne un déséquilibre dans la distribution des charges sur l'articulation, ce qui mène à un mauvais alignement global de l'articulation. Ceci accentue alors la progression des dommages au niveau de l'articulation, notamment au niveau du fibrocartilage et du cartilage hyalin (Felson, 2009; Radin et al., 1984). En réponse à ces dommages, les chondrocytes déclenchent de manière transitoire une réponse proliférative et une augmentation de la synthèse de la matrice (Xia et al., 2014). Cependant, à un certain moment, les chondrocytes entrent en phase de différenciation hypertrophique et des changements de composition de la structure du cartilage articulaire prennent place. Ces modifications stimulent alors les chondrocytes à produire davantage de facteurs cataboliques, soit des médiateurs inflammatoires ainsi que des enzymes de dégradation qui conduisent à l'apoptose cellulaire et à la destruction du réseau de protéoglycanes et de collagène (Mease et al., 2011; Xia et al., 2014).

Du coup, afin d'apprécier la contribution des autres tissus articulaires dans la progression de la maladie, il faut se rappeler que le cartilage est un tissu non vascularisé et par le fait même non innervé. Ainsi, les dommages au niveau du cartilage ne génèrent pas directement la douleur arthrosique (Fu et al., 2018). En effet, simultanément à la réduction de l'espace articulaire généré par l'atteinte du cartilage, est engendré un remodelage de l'os sous-chondral ainsi qu'une ossification endochondrale et la formation d'ostéophytes. Ces changements structuraux importants contribuent ainsi inévitablement à l'inflammation et à la douleur (Aso et al., 2019; Felson, 2009; Goldring, 2009; Mease et al., 2011). À cela s'ajoute également l'inflammation de la membrane synoviale (synovite), qui se manifeste par la sécrétion de fluide synovial en grande quantité. L'accumulation de ce fluide est alors responsable de l'enflure de la capsule articulaire, génératrice majeure de douleur. Une certaine inhibition de l'activation des muscles entourant l'articulation en serait d'ailleurs une conséquence, alors qu'un réflexe spinal serait activé par la distension de la capsule articulaire. Ceci causerait par le fait même une atrophie neurogène, et amplifierait l'atrophie et la faiblesse musculaire (Felson, 2009; Fu et al., 2018).

Au cours de la cascade d'événements menant à la destruction du cartilage et au remodelage de l'os sous-chondral survient l'interaction de diverses cytokines telles, le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF- α) ainsi que plusieurs interleukines inflammatoires,

chimiokines, facteurs de croissance neuraux, amines sympathiques, leucotriènes, prostaglandines et métalloprotéinases matricielles (MMP) (Mease et al., 2011; Noh et al., 2018; Xia et al., 2014). À ceci s'ajoute d'autant plus une libération accrue de médiateurs inflammatoires tels que la bradykinine (BK), l'histamine, l'acide lactique, la substance P (SP), *etc.* (Mease et al., 2011). La présence et l'action de tous ces facteurs engendrent de fait une boucle de rétroaction positive qui mène ainsi à la relâche de davantage de facteurs cataboliques et médiateurs inflammatoires, amplifiant en outre les dommages (Fusco et al., 2017). Comme mentionné, les dommages tissulaires impliquent aussi la synovie, qui présente d'ailleurs une infiltration importante de cellules inflammatoires telles que, les macrophages et les mastocytes (Fusco et al., 2017; Mease et al., 2011). L'inflammation décrite ici favorise la mise en place d'un environnement hypoxique au niveau de l'articulation, ce qui stimule le phénomène d'angiogenèse caractérisé par la formation de nouveaux vaisseaux et terminaisons nerveuses, amplifiant ainsi une fois de plus l'inflammation et la douleur (Fusco et al., 2017; Mease et al., 2011; Noh et al., 2018).

Du coup, le déséquilibre engendré dans l'homéostasie du cartilage articulaire impliquant l'expression des facteurs anaboliques et cataboliques mène ultimement à l'atteinte pathologique de l'ensemble des structures articulaires. C'est alors que chaque composante de l'articulation participe aux dommages et au remodelage caractéristiques de l'arthrose par la sécrétion de divers médiateurs (cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance, protéase) (Figure 2 panneau B, p.28) (Kuyinu et al., 2016). Ainsi, pour comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la douleur arthrosique, il est nécessaire de prendre en compte l'interaction qu'ont entre elles les différentes composantes articulaires. Néanmoins, il est intéressant de noter que certaines études ont permis de démontrer que la douleur était plus fortement associée aux lésions dans la moelle osseuse, à la synovite et à l'effusion articulaire, qu'aux dommages au niveau du cartilage non innervé (Aso et al., 2019; Fu et al., 2018; Fusco et al., 2017; Hill et al., 2001; Moreau et al., 2013).

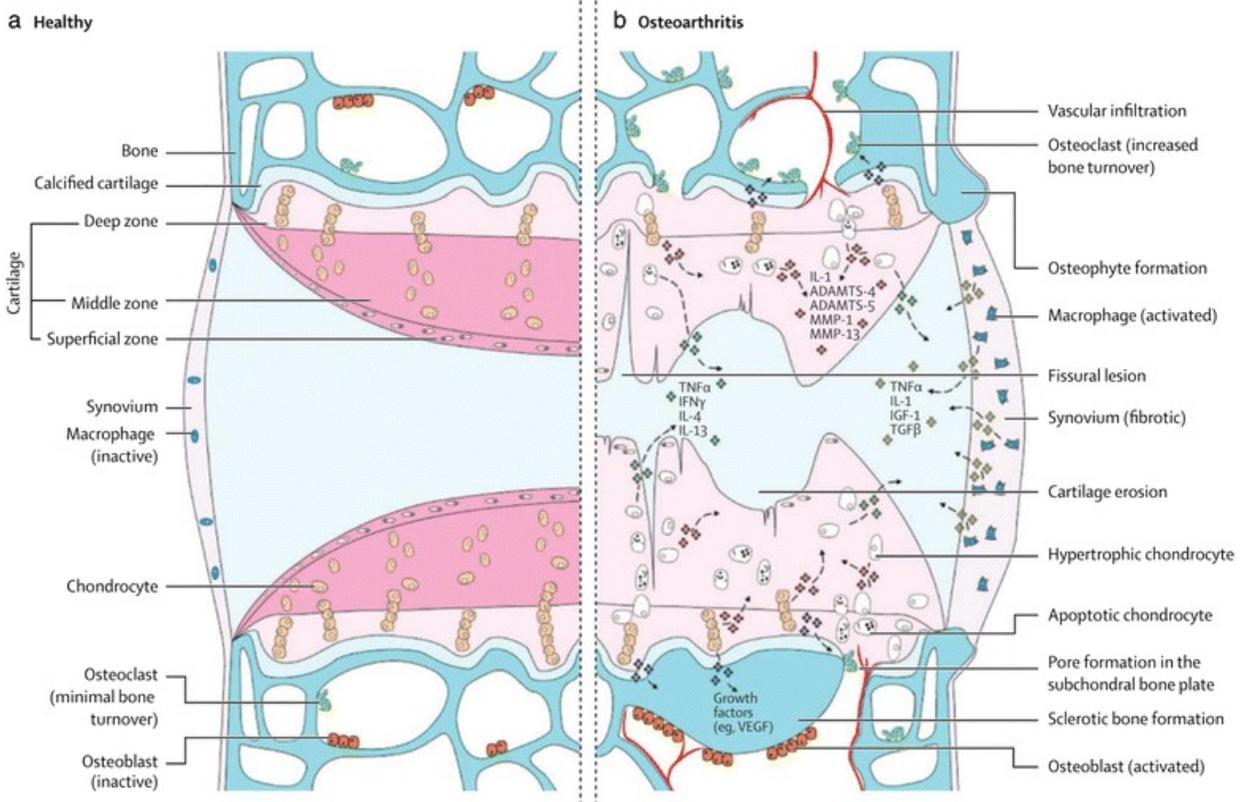


Figure 2. Changements structuraux et voies de signalisation d'une articulation normale (A) et arthrosique (B).

La pathogenèse de l'arthrose implique l'altération de composantes de l'articulation synoviale, qui soutiennent en temps normal l'articulation. La dégénération du cartilage, un remodelage osseux anormal, la formation d'ostéophytes et la présence d'inflammation au niveau articulaire sont les principales lésions engendrées par la perte de l'homéostasie des chondrocytes, où l'expression de plusieurs facteurs anaboliques et cataboliques est dérégulée. Désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine (ADAMTS), interleukine (IL), facteur de croissance de transformation bêta (TGF β), facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-1), métalloprotéinase matricielle (MMP), facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), interféron gamma (IFN γ), facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α). Figure tirée de (Glyn-Jones et al., 2015) et modifiée par (Kuyinu et al., 2016).

1.3. La douleur

Puisque la douleur articulaire est le symptôme le plus important chez les patients arthrosiques, la section présente vise à décrire le fonctionnement et l'organisation du système nerveux, ainsi que les processus neuropathologiques menant à ce symptôme débilitant.

1.3.1. Organisation et physiologie de la nociception

Tout d'abord, il est possible de diviser les cellules du système nerveux en deux grandes catégories, soit les cellules nerveuses (ou **neurones**) et les cellules de support, appelées cellules **gliales**. Ces dernières incluent trois types cellulaires dont les rôles ont été définis comme suit: les astrocytes, qui assurent le maintien d'un environnement chimique adéquat au sein du système nerveux central; les oligodendrocytes, qui entourent certains neurones d'une gaine de myéline pour accélérer la conduction des potentiels d'action au niveau du système nerveux central; et enfin, les cellules de la microglie. Ces dernières s'apparentent aux macrophages retrouvés dans les autres tissus, ayant comme fonction de nettoyer l'environnement des débris cellulaires s'y retrouvant lors d'une lésion ou du remplacement normal de cellules. De plus, tout comme les macrophages, les cellules de la microglie sécrètent des cytokines lors d'inflammation locale, influençant alors la survie ou la mort cellulaire (Purves et al., 2015a).

Typiquement, l'organisation du système nerveux comporte deux divisions fonctionnelles principales, l'une comprenant les voies **afférentes** (ou **sensorielles**) et l'autre comprenant les voies **efférentes** (ou **motrices**). Ainsi, le système afférent transmet les signaux des organes et tissus en périphérie vers le cerveau alors que le système efférent communique les signaux provenant du système nerveux central (cortex, tronc cérébral, moelle épinière) vers la périphérie. Le système nerveux efférent est divisé en deux systèmes à son tour, soit le système nerveux somatique (ou volontaire) et le système nerveux autonome, qui se compose de voies involontaires, sympathiques et parasympathiques (de Lahunta, Glass, & Kent, 2015; Purves et al., 2015a). Du point de vue anatomique, le système nerveux comprend également deux divisions: le système nerveux périphérique et le système nerveux central. Le système nerveux périphérique comprend les nerfs crâniens, les nerfs spinaux et leurs racines, ainsi que les nerfs périphériques. Alors que le système nerveux central, lui, est composé du cerveau et de la moelle épinière (Purves et al., 2015a; Ruckebush, 1991). De manière brève, les signaux ou influx

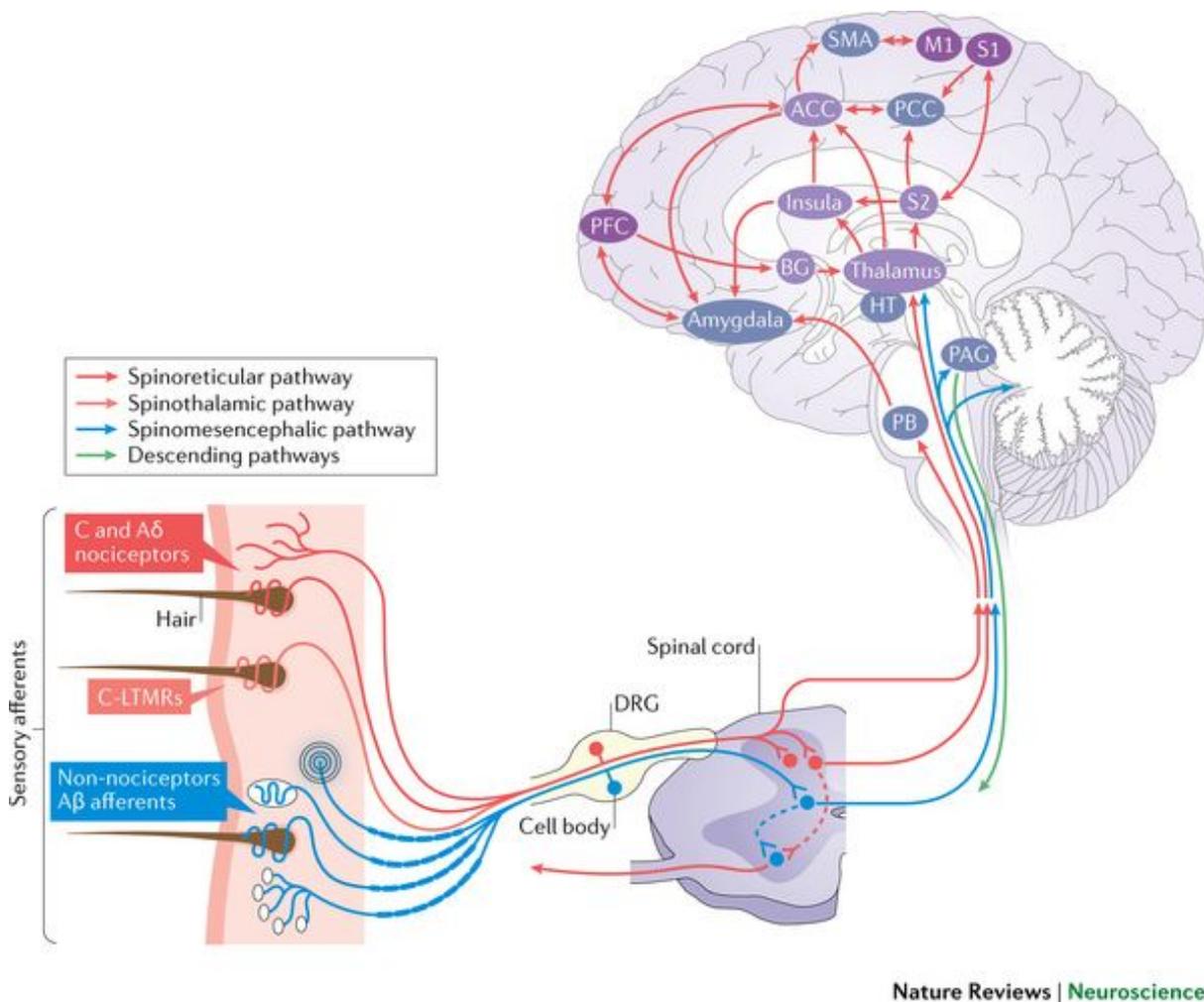
généralisés au niveau périphérique sont transmis à partir d'un organe receveur vers un centre d'intégration et de traitement au sein du système nerveux central puis, un signal répondant aux stimuli initiaux est retourné vers un organe effecteur. Les neurones sont les cellules qui transmettent les influx nerveux. Ceux-ci possèdent ainsi une portion qui permet la réception d'informations en provenance des autres cellules nerveuses ou des organes récepteurs et, une portion émettrice qui elle, transmet les informations à d'autres cellules nerveuses ou à des organes effecteurs. La portion réceptrice des neurones est formée de dendrites. Lorsqu'une information est perçue par un dendrite, celle-ci est convertie en influx nerveux. L'influx voyagera alors dans la portion émettrice du neurone, soit de longues extensions cytoplasmiques nommées axones ou fibres nerveuses (de Lahunta et al., 2015; Ruckebush, 1991).

La moelle épinière est un site où survient une interaction importante entre les systèmes nerveux périphérique et central. Celle-ci est constituée de matière blanche et de matière grise. En effet, les axones des neurones sont recouverts d'une gaine de myéline et composent la matière blanche. Celle-ci recouvre la matière grise, qui elle, se compose des corps cellulaires de neurones. La matière blanche est conceptuellement divisée en cordons dorsaux, latéraux et ventraux regroupant chacun les axones de neurones possédant une fonction ou une destination semblable. Les voies sensorielles ascendantes proprioceptives ou nociceptives qui voyagent crânialement vers le cerveau se localisent principalement dans les cordons dorsaux et latéraux. Les neurones moteurs supérieurs en provenance du cerveau sont, pour leur part, plutôt localisés dans les cordons latéraux et ventraux (Dewey, 2016). De manière semblable, il est possible de diviser la matière grise de la moelle épinière en cornes ventrales et dorsales (Klinck & Troncy, 2016). Les cornes dorsales comprennent les synapses des neurones afférents de premier ordre avec les interneurones, ou encore avec les neurones afférents de second ordre du système nerveux central. En ce qui concerne les cornes ventrales, ce sont les synapses des neurones moteurs supérieurs avec les corps cellulaires des neurones moteurs inférieurs (efférents) qui s'y retrouvent (Purves et al., 2015a; Ruckebush, 1991). La moelle épinière peut d'autant plus être divisée en cinq régions : cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et caudale. Chacune de ces régions peut ensuite être divisée en plusieurs segments spinaux, chacun associé à une paire de nerfs spinaux. Ces nerfs spinaux sont composés de fibres mixtes, étant formés de neurones moteurs inférieurs et de neurones sensitifs, ceux-ci composant respectivement les

racines ventrale et dorsale d'un nerf spinal donné (de Lahunta et al., 2015; Pasquini, Spurgeon, & Pasquini, 2007b). Un nerf spinal segmentaire est donc formé d'une racine dorsale et d'une racine ventrale se rejoignant au niveau du foramen vertébral. Le nerf spinal quitte ensuite la moelle épinière au niveau d'un espace intervertébral donné et l'union de plusieurs nerfs spinaux mène à la formation de nerfs périphériques (de Lahunta et al., 2015).

De manière simpliste, les voies nociceptives correspondent à une chaîne composée de trois neurones, soit le neurone de premier ordre provenant de la périphérie qui se projette à la moelle épinière, le neurone de second ordre qui fait ascension dans la moelle épinière et le neurone de troisième ordre qui se projette aux différentes structures cérébrales incluant le thalamo-cortex, le cervelet et le tronc cérébral, ce dernier se divisant notamment en mésencéphale, pons et moelle allongée rostrale et caudale (Dewey, 2016; Kuner & Flor, 2016; Tranquilli, Grimm, & Lamont, 2004). Alors que la douleur est ultimement perçue au niveau du cortex cérébral, les stimuli afférents seront sujets à diverses régulations inhibitrices ou facilitatrices par le système modulateur descendant prenant origine principalement au niveau du tronc cérébral (Figure 3, p.32) (Bee & Dickenson, 2008; Kuner & Flor, 2016; Tranquilli et al., 2004). La nociception correspond donc au processus physiologique qui mène à une perception consciente de la douleur, où trois processus physiologiques peuvent être distingués, soit la transduction, la transmission (ou conduction) et la modulation. Une fois ces processus complétés, une intégration par les fonctions thalamo-corticale, réticulaire et limbique permet finalement la production de l'expérience émotionnelle et subjective consciente (cognitivo-évaluative) de la douleur (Kuner & Flor, 2016; Tranquilli et al., 2004). On retrouve dès lors trois déterminants principaux de la douleur (Melzack & Casey, 1968); à savoir sensori-discriminatif (propriétés spatio-temporelles du stimulus nocif, comme intensité, localisation et durée), motivationnel-affectif (incluant le *modus aversif*, et les réponses émotionnelles à la douleur), et cognitif et évaluatif (contrôle central associé à l'interprétation de l'expérience douloureuse, et lié à une variété de facteurs tels que la mémoire de la douleur issue des expériences douloureuses passées, l'attention, le *background* culturel, et la signification attribuée à la douleur, aussi bien qu'au conditionnement préalable face à la douleur). Les structures anatomiques et les mécanismes neurophysiologiques retrouvés chez l'humain sont très similaires à ce que l'on retrouve chez certaines espèces animales (Tranquilli et al., 2004). Du coup, nous nous

permettons d’assumer qu’un stimulus douloureux chez l’Homme qui entraîne des dommages ou un risque de dommages tissulaires, et qui induit chez l’animal des réponses d’évitement et comportementales peut être présumé comme étant également douloureux chez ces animaux.



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 3. Schéma général de voies nociceptives de la périphérie au cerveau.

Les fibres sensorielles périphériques afférentes de neurones de premier ordre qui assurent la transduction des influx nerveux sont diversifiées, chacune ayant une fonction spécifique; les fibres nociceptives Aδ et C à seuil élevé, les fibres C à mécanorécepteurs de faible seuil (C-LTMRs) et les fibres Aβ non-nociceptives afférentes. Il existe aussi des nocicepteurs silencieux qui sont « recrutés » en présence d’un processus pathologique. Au niveau de la moelle épinière, ces fibres font synapse avec les neurones de second ordre des voies spinoréticulaire, spinothalamique et spinomesencéphalique, soit les principales voies ascendantes transmettant les influx nerveux vers le cerveau. L’activation de ces neurones suite à une stimulation nociceptive est alors cruciale dans le processus de perception de la douleur. La transmission des influx nerveux est cependant modulée (positivement ou négativement) par diverses structures cérébrales *via* les voies descendantes. L’intégration au niveau cérébral des diverses composantes de la douleur est ultimement permise par les multiples connexions entre les différentes structures cérébrales. La perception consciente de la douleur est ainsi une véritable expérience

émotionnelle et cognitivo-évaluative (subjective). Cortex cingulaire antérieur (ACC), ganglion basal (BG), ganglion de la racine dorsale (DRG), hypothalamus (HT), cortex moteur primaire (M_1), substance grise périaqueducale (PAG), noyau péribrachial (PB), cortex cingulaire postérieur (PCC), cortex préfrontal (PFC), cortex somatosensoriel primaire (S_1), aire motrice supplémentaire (SMA). Figure tirée de (Kuner & Flor, 2016).

Nociception et système nerveux périphérique

Les neurones sensoriels de premier ordre transmettent normalement les signaux de la périphérie vers les neurones de second ordre de la moelle épinière, faisant synapse dans diverses couches (ou lames) de la corne dorsale (Klinck & Troncy, 2016). Les neurones de premier ordre ont tous une structure semblable qui consiste en une zone réceptrice à l'extrémité terminale périphérique de l'axone, une fibre axonale périphérique, un corps cellulaire situé au niveau du ganglion de la racine dorsale et une fibre axonale avec une terminaison au niveau central dans la corne dorsale de la moelle épinière (Gold & Gebhart, 2010; Tranquilli et al., 2004). En temps normal, les différents types de récepteurs sont sensibles à certaines formes d'énergie spécifiques, c'est-à-dire qu'ils sont activés par un stimulus en particulier. D'ailleurs, c'est en fonction de cette sensibilité qu'ils sont classifiés. Ainsi, il existe des thermorécepteurs, des mécanorécepteurs, des chimiorécepteurs et des photorécepteurs (Ruckebush, 1991; Tranquilli et al., 2004). Il existe cependant certains récepteurs, non sélectifs quant au type d'énergie engendrant une réponse, et ceux-ci répondent alors à n'importe quels stimuli d'assez grande intensité pour potentiellement endommager un tissu (Purves et al., 2015a; Ruckebush, 1991; Tranquilli et al., 2004). Ces récepteurs sont constitués par les « terminaisons libres » des branches périphériques des axones nociceptifs, et se nomment du coup nocicepteurs (Purves et al., 2015a). De manière évidente, les nocicepteurs sont responsables de la transduction des signaux nociceptifs, initiant notamment une réponse à la douleur *via* la genèse d'une activité réflexe qui permet à l'organisme de se retirer du stimulus douloureux (Ruckebush, 1991; Tranquilli et al., 2004).

Il est possible de distinguer différents types de fibres sensorielles nociceptives, celles-ci se divisant globalement en deux catégories, soit les fibres $A\delta$ et les fibres C à seuil élevé (Klinck & Troncy, 2016; Purves et al., 2015a). Les fibres $A\delta$ sont peu myélinisées (1-5 μm de diamètre), elles transmettent donc les signaux à une vitesse relativement rapide (~ 20 m/s). Ces fibres sont alors responsables de la transmission de la douleur primaire (ou rapide). Les fibres C sont pour

leur part non myélinisées (0.2-1.5 μm de diamètre), elles propagent ainsi la douleur secondaire, transmettant les signaux à une vitesse plus lente (<2 m/s) (Klinck & Troncy, 2016; Purves et al., 2015a; Tranquilli et al., 2004). Par ailleurs, les fibres A δ sont classifiées selon deux types de nocicepteurs. Celles du type I sont associées à des nocicepteurs qui répondent aux stimuli chimiques et mécaniques, mais qui ont un seuil élevé de réponse à la chaleur. À l'inverse, celles du type II sont associées à des nocicepteurs qui possèdent un seuil de réponse à la chaleur plus bas, ce seuil est toutefois plus élevé pour les stimuli mécaniques (Klinck & Troncy, 2016; Purves et al., 2015a). Les fibres C à seuil élevé sont des nocicepteurs répondant aux stimuli nocifs chimiques, thermiques et mécaniques cependant, certaines fibres sont insensibles aux stimuli mécaniques à moins d'y être sensibilisées. Ces fibres C peuvent également se distinguer en deux classes, soit les fibres C peptidergiques ou non peptidergiques (Klinck & Troncy, 2016). Les premières ont la capacité de relâcher des peptides tels la SP ainsi que le peptide apparenté au gène de la calcitonine (CGRP, pour *Calcitonin-Gen-Related Peptide*), et possèdent des récepteurs pour le facteur de croissance neuronal (NGF) relâché par des cellules neuronales. Celles-ci seraient ainsi impliquées dans la douleur inflammatoire et l'inflammation neurogène (Chiu, von Hehn, & Woolf, 2012; Klinck & Troncy, 2016). Pour leur part, les fibres C non peptidergiques possèdent des récepteurs pour des facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales et seraient alors impliquées davantage au niveau de la douleur neuropathique (Golden et al., 2010; Klinck & Troncy, 2016).

Ainsi, plusieurs fibres nociceptives A δ et fibres C innervent diverses structures de l'articulation synoviale, dont la capsule articulaire, la membrane synoviale, les ligaments et ménisques ainsi que le périoste et l'os sous-chondral (Fu et al., 2018; Tranquilli et al., 2004). En temps normal, la majorité des nocicepteurs de ces fibres reste silencieuse et ils s'activent seulement lorsque l'articulation est en contact avec des substances chimiques, ou lorsque celle-ci est menacée mécaniquement. Les chémorécepteurs sont notamment activés par certains ions (H^+ notamment) et médiateurs inflammatoires, tels que la sérotonine, l'histamine, la BK et les prostanoïdes. Les mécanorécepteurs de ces fibres nociceptives s'activent lors de stimuli mécaniques de force relativement grande, par exemple lors d'une rotation contre la résistance d'un muscle ou encore lors de l'application d'une grande pression (Arendt-Nielsen, Skou, Nielsen, & Petersen, 2015; Eitner et al., 2017).

Il existe un troisième type de neurones sensoriels, à savoir les fibres A β , qui ne transmettent pas la douleur en conditions normales. Ces fibres innervent sensiblement les mêmes structures que les fibres nociceptives, mais sont plutôt activées par le mouvement articulaire. Ces fibres nerveuses sont alors responsables de transmettre les informations mécanosensorielles et proprioceptives (Fu et al., 2018; Salaffi et al., 2014). Par ailleurs, les fibres A β sont plus myélinisées que les fibres nociceptives A δ et C. L'activation des fibres A β intervient d'autant plus dans la modulation de la transmission des influx nociceptifs, inhibant certains signaux de douleur transmis par les fibres nociceptives (Fu et al., 2018; Klinck & Troncy, 2016).

Nociception et système nerveux central

Comme mentionné, les neurones primaires afférents qui innervent l'articulation synoviale ont la responsabilité de transmettre les signaux nociceptifs jusqu'aux cornes dorsales de la moelle épinière (Pasquini et al., 2007b). C'est alors qu'ils ont la possibilité de faire synapse avec trois différentes populations de neurones; des interneurons soit excitateurs soit inhibiteurs; des neurones propriospinaux impliqués dans l'activité réflexe segmentée; et des neurones de projection qui s'étendent aux centres supraspinaux, tels que le mésencéphale et le cortex (Klinck & Troncy, 2016; Lorenz, Coates, & Kent, 2011; Tranquilli et al., 2004). Ainsi, c'est au niveau de la corne dorsale que l'intégration initiale et la modulation des signaux nociceptifs surviennent (Tranquilli et al., 2004). Cette structure a été divisée par Bror Rexed en 10 lames (Rexed, 1952), chacune contenant les divers noyaux sensoriels qui reçoivent et traitent les informations somatosensorielles, avant de les envoyer, *via* différentes voies, aux diverses régions corticales du cerveau, voire initier un arc réflexe avec réponse motrice (Klinck & Troncy, 2016; Rexed, 1952; Ruckebush, 1991). Les colonnes dorsales sont les principales voies de transmission pour la sensation du toucher cutané et les sensations perçues aux niveaux articulaire, musculaire et des tendons. La voie spinothalamique est quant à elle importante en ce qui concerne la transmission des informations nociceptives de la corne dorsale au cerveau (Klinck & Troncy, 2016). À partir des noyaux du thalamus, plusieurs projections, soit des voies directes ou indirectes, relaient l'information nociceptive vers diverses régions du cortex cérébral (Klinck & Troncy, 2016; Ruckebush, 1991). Du coup, l'activation du cortex somato-sensoriel secondaire a été décrite comme ayant une importance particulière dans la physiopathologie de l'arthrose.

Les voies descendantes auraient également une implication dans la modulation de la transmission des signaux de douleur (Bee & Dickenson, 2008; Klinck & Troncy, 2016). Ces voies agissent principalement par l'inhibition, mais peuvent également être facilitatrices (Klinck & Troncy, 2016).

Suivant le transfert d'informations nociceptives entre les neurones de premiers et seconds ordres survenant au niveau des synapses de la corne dorsale, diverses conséquences peuvent se produire. Celles-ci incluent notamment la protection musculaire qui survient lors de blessures, les réflexes de retrait et la modulation du système nerveux autonome (Klinck & Troncy, 2016; Lorenz et al., 2011). Cette communication est produite par le relâchement de neurotransmetteurs à la synapse (Figure 4, p.38). Ces molécules peuvent être directement excitatrices et/ou neuromodulatrices, et la quantité de molécules relâchées est proportionnelle à l'intensité de la stimulation du nocicepteur. Parmi les neurotransmetteurs qui agissent au niveau des synapses du système nerveux central, le glutamate constitue le principal excitateur (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2013; Klinck & Troncy, 2016). Les récepteurs à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), au *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) et au kaïnate sont différents récepteurs ionotropes du glutamate identifiés (Purves et al., 2015b). Ces récepteurs sont des canaux non sélectifs des cations Na^+ , K^+ et parfois Ca^{2+} . L'ouverture de ces canaux entraîne ainsi un potentiel d'inversion post-synaptique plus positif que le seuil du potentiel d'action, ce qui permet alors l'excitation des cellules post-synaptiques. Le glutamate se lie également à des récepteurs métabotropes. Ces récepteurs couplés à une protéine G se situent généralement à côté des récepteurs ionotropes et permettent la modulation des canaux ioniques post-synaptiques de manière indirecte (Klinck & Troncy, 2016; Purves et al., 2015b). D'autres neuromodulateurs sont d'autant plus impliqués dans l'excitation des neurones, par exemple la SP qui se lie au récepteur à la neurokinine 1 (NK1) (Klinck & Troncy, 2016).

À l'inverse, la glycine est un neurotransmetteur important qui agit au niveau des synapses inhibitrices du cerveau et de la moelle épinière. Les récepteurs de la glycine sont des canaux ioniques perméables au Cl^- . Ceux-ci engendrent un potentiel d'inversion post-synaptique plus négatif que le seuil de décharge des neurones, menant donc à l'inhibition des cellules post-synaptiques (Purves et al., 2015b). Ce neurotransmetteur possède de surcroît une fonction de

modulateur allostérique. En effet, il est co-agoniste du glutamate puisqu'il possède un site de liaison au niveau des récepteurs NMDA (Kandel et al., 2013; Klinck & Troncy, 2016; Purves et al., 2015b). L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), synthétisé à partir du glutamate, est également présent en forte concentration dans le système nerveux central, mais il est aussi retrouvé dans d'autres tissus. Cet amino-acide est particulièrement utilisé par plusieurs interneurons inhibiteurs dans la moelle épinière alors qu'au niveau cérébral il représente le principal transmetteur inhibiteur des neurones et interneurons (Kandel et al., 2013). Il existe trois types de récepteurs au GABA, soit les récepteurs GABA_A, GABA_B et GABA_C. Les récepteurs GABA_A et GABA_C sont des canaux inotropes, essentiellement perméables au Cl⁻. Pour sa part, GABA_B est un récepteur métabotrope qui active des canaux K⁺ ou encore, qui peut bloquer des canaux Ca²⁺, menant ainsi à l'hyperpolarisation des neurones post-synaptiques (Purves et al., 2015b).

À ces neurotransmetteurs, s'ajoutent plusieurs petites molécules qui ont une action au niveau neuronal, telles que les monoamines biogéniques et les neuropeptides. Il est à noter que ces molécules ne sont pas propres au système nerveux central, mais y jouent néanmoins un rôle de régulation important. Les monoamines biologiques ont une influence notable sur une multitude de comportements, affectant par exemple des fonctions homéostatiques centrales ou encore des activités cognitives telles que l'attention. Cinq monoamines sont reconnues comme neurotransmetteurs, soit l'histamine, la sérotonine, ainsi que trois catécholamines – dopamine, noradrénaline et adrénaline (Purves et al., 2015b). En ce qui a trait aux neurotransmetteurs peptidiques, ils sont plutôt connus en tant qu'hormones (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2015b). Ces molécules incluent notamment les opioïdes, les tachykinines, les sécrétines et les somatostatines. Comme toutes autres protéines sécrétées, les neurotransmetteurs peptidiques sont produits dans le corps cellulaire des neurones, avant d'être transportés dans une vésicule vers les terminaisons axonales où ils sont relâchés. Ces peptides aux fonctions endocriniennes à l'extérieur du système nerveux se voient attribuer un rôle de neurotransmetteur, lorsque relâchés à proximité d'un neurone cible, où ils auront une action soit inhibitrice, excitatrice ou mixte. Ainsi, au niveau du système nerveux central, les peptides neuroactifs sont impliqués dans la modulation de la perception sensorielle et des émotions. Il est d'ailleurs intéressant de noter que certains de ceux-ci sont préférentiellement retrouvés dans des régions associées à la

perception de la douleur. Les neuropeptides relâchés en tant que co-transmetteurs par les nocicepteurs aux axones non myélinisés incluent notamment la SP, CGRP et la somatostatine (STT, ou *SST* en anglais) (Kandel et al., 2013).

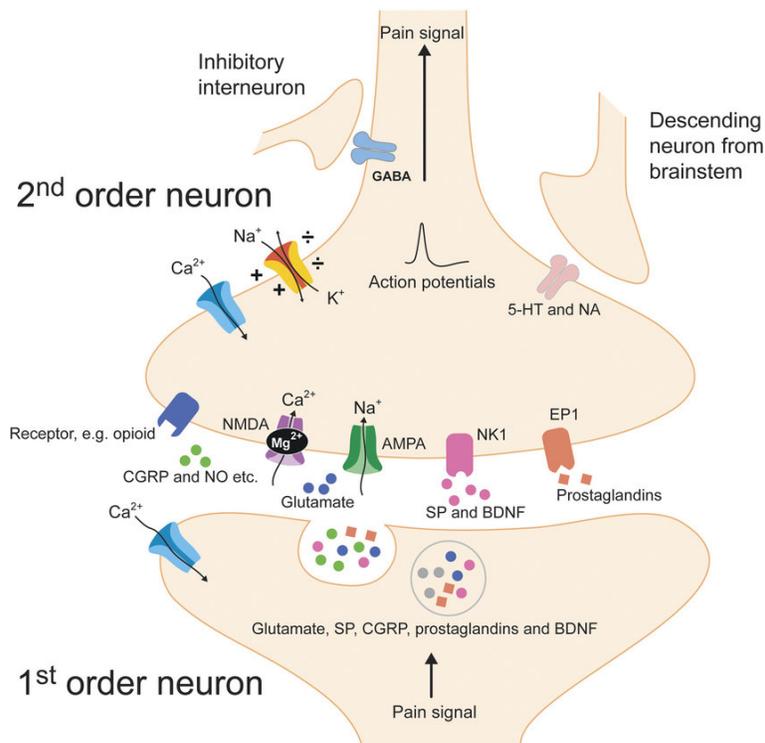


Figure 4. Représentation simplifiée de la transmission à la synapse entre les neurones de premier et second ordre.

Au niveau central, les terminaisons des nocicepteurs afférents de premier ordre relâchent des neurotransmetteurs qui incluent entre autres le glutamate, la SP, le CGRP, des prostaglandines et des facteurs de croissance (e.g. le *brain-derived neurotropic factor* (BDNF)). Les acides aminés excitateurs tels que le glutamate peuvent se lier à différents récepteurs, dont les récepteurs AMPA et NMDA, ainsi qu'à des récepteurs métabotropes. Ces récepteurs sont situés sur la membrane post-synaptique (neurones de second ordre). La SP est généralement associée au récepteur NK1, alors que les prostaglandines lient le récepteur EP1. La liaison des neurotransmetteurs aux récepteurs de la membrane post-synaptique permet l'entrée de cations, tels le Na^+ , le K^+ et parfois le Ca^{2+} . Ceci entraîne un potentiel d'action permettant l'excitation des cellules post-synaptiques. En ce qui concerne les interneurons inhibiteurs, c'est par la relâche de GABA et de glycine (non représentée sur le schéma) qu'ils transmettent leurs signaux répressifs au site de la synapse. Les voies inhibitrices descendantes qui proviennent du tronc cérébral agissent plutôt en relâchant des monoamines comme la sérotonine (*5HT*) et la noradrénaline (*NA*), ou encore en activant de petits interneurons contenant des opioïdes. Figure tirée de (Olesen, Andresen, Staahl, & Drewes, 2012).

1.3.2. Définition et présentation de la douleur arthrosique

La définition de la douleur chez l'humain selon l'*International Association for Study of Pain* (ISAP) est la suivante, soit « une expérience sensorielle et émotionnelle déplaisante associée à un dommage tissulaire existant ou potentiel, ou décrite en termes d'un tel dommage » (International Association for the Study of Pain, 1979). Pour décrire la douleur chez l'animal, étant donné que ces derniers ne peuvent pas décrire leur douleur, Molony et Kent (1997) ont proposé la définition suivante : « une expérience sensorielle et émotionnelle déplaisante qui fait constater à l'animal un dommage ou une menace pour l'intégrité de ses tissus; la douleur entraîne un changement dans la physiologie et le comportement de l'animal afin de diminuer ou éviter un dommage, pour réduire la probabilité de redondance et pour promouvoir la guérison » (Moloney & Kent, 1997). Ainsi, la douleur n'est pas simplement une expérience sensorielle, mais bien une sensation de nature multidimensionnelle (Klinck & Troncy, 2016).

Diverses composantes de la douleur ont d'ailleurs été décrites. D'abord, la composante sensorielle provient de la forte stimulation des fibres nociceptives à conduction rapide (A δ), qui entraînent un réflexe de retrait et qui relaient l'information au cerveau, sans toutefois générer une sensation désagréable. Ensuite, la composante émotionnelle entre en jeu et ceci est dû à la stimulation des fibres nociceptives à conduction lente (C). Ces fibres sont multisynaptiques et permettent par le fait même le relais d'information au système limbique, entre autres. Ceci permet notamment de générer une réponse de protection dans la région où le tissu a été endommagé. La composante cognitivo-évaluative quant à elle représente plutôt la perception de la douleur, c'est-à-dire les associations faites par l'animal et les réponses conditionnées. Enfin, la composante motrice de la douleur implique les mouvements et les postures entraînés par la douleur et par l'évitement de la douleur. Ensemble, ces deux dernières composantes agissent de pair pour définir l'expérience de la douleur et de la souffrance (Klinck & Troncy, 2016).

Dû au fait que la douleur est une condition ayant plusieurs étiologies, celle-ci peut se manifester de diverses façons. Il est ainsi possible de dénombrer différents types de douleur (nociceptive, inflammatoire, neuropathique, *etc.*) qui agissent *via* divers mécanismes neurobiologiques (Fu et al., 2018; Klinck & Troncy, 2016). La douleur arthrosique est chronique, c'est-à-dire que la douleur engendrée par la lésion initiale perdure, et ce, même après le temps de guérison normalement attendu (Klinck & Troncy, 2016). Plusieurs états de douleur

dite chronique, telle qu'observée dans l'arthrose, sont en fait constitués à l'origine d'une combinaison de divers types de douleur, on parle alors de « douleurs mixtes » (Clauw & Hassett, 2017; Klinck & Troncy, 2016). Initialement, la douleur arthrosique serait une douleur nociceptive aigüe (c.-à-d. physiologique ou normale) causée par le mauvais fonctionnement d'une articulation endommagée. Les changements biomécaniques articulaires et la présence d'inflammation entraîneraient alors l'ouverture de canaux ioniques au niveau des terminaisons de nerfs nociceptifs. L'amplification des signaux nociceptifs en résultant mènerait éventuellement à l'établissement de la douleur arthrosique, soit une douleur inadéquate (Felson, 2009; Fu et al., 2018). Par ailleurs, certains mécanismes moléculaires correspondraient à des processus impliqués dans la douleur neuropathique, suggérant ainsi la contribution de douleurs non seulement nociceptive et inflammatoire, mais également neuropathique (Mease et al., 2011). Cette observation reflète d'autant plus l'implication d'une sensibilisation des neurones au niveau périphérique et central.

1.3.3. Physiopathologie de la douleur arthrosique

Nociception articulaire

La présence de nocicepteurs dans la majorité des composantes de l'articulation représente la source primaire de douleur dans l'arthrose (Arendt-Nielsen, 2017; Fu et al., 2018). Les dommages structuraux survenant au niveau de l'ensemble des tissus articulaires, tels que le développement d'ostéophytes et de lésions de la moelle osseuse, ainsi que d'un remodelage déficient de l'os sous-chondral et du cartilage, contribuent de manière importante à la physiopathologie de l'arthrose et sa douleur (Arendt-Nielsen, 2017; Fusco et al., 2017; Moreau et al., 2013). Ces atteintes seraient d'ailleurs corrélées avec l'hyperplasie et l'hyperactivation des mastocytes au niveau articulaire. Ces cellules inflammatoires seraient localisées principalement dans la membrane synoviale et la capsule articulaire, mais également le long des vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses (Fusco et al., 2017). Cette observation concorderait par le fait même avec l'établissement d'une néovascularisation dans l'articulation synoviale, mais également avec le recrutement et l'infiltration de diverses autres cellules inflammatoires et immunitaires (Krustev, Rioux, & McDougall, 2015). Les mastocytes ont ainsi été ciblés comme étant d'importants joueurs dans la mise en place de processus neuro-

inflammatoires dans les diverses pathologies articulaires (Fusco et al., 2017). Plusieurs médiateurs, notamment des prostanoïdes, des cytokines, des neuropeptides et des protéinases sont alors relâchés au niveau articulaire. Chacun de ces médiateurs possède alors des fonctions spécifiques dans l'inflammation articulaire ainsi que dans les processus dégénératifs et destructifs (Fusco et al., 2017; Krustev et al., 2015). Par ailleurs, les changements au niveau de la vascularisation articulaire ainsi que la présence accrue du NGF permettent l'établissement d'une innervation sensorielle et sympathique dans le cartilage, initialement non vascularisé et non innervé (Krustev et al., 2015; Salaffi et al., 2014). En effet, conjointement à la vascularisation du cartilage articulaire, la présence de fibres nerveuses sympathiques et sensorielles a été notée chez des patients atteints d'arthrose modérée et sévère. Des fibres nerveuses périvasculaires ainsi que des fibres libres seraient également présentes dans la moelle osseuse de l'os sous-chondral (Arendt-Nielsen et al., 2015).

Du coup, les changements structuraux et le remodelage de l'os sous-chondral en combinaison avec la présence accrue de médiateurs inflammatoires, ainsi que le développement d'une néovascularisation et l'accroissement de l'innervation dans l'articulation entraînent inévitablement une transmission active de signaux nociceptifs à la moelle épinière (Arendt-Nielsen, 2017; Salaffi et al., 2014). À long terme, ces signaux nociceptifs répétés et amplifiés mènent potentiellement au phénomène de sensibilisation à la douleur. Cette sensibilisation, tant au niveau périphérique que central, se traduit en un seuil diminué de réponse aux stimuli nocifs, avec une augmentation de l'amplitude de cette réponse. Il est d'autant plus possible de noter une réponse à des stimuli non nocifs, de même que la transmission spontanée de signaux nociceptifs (Gold & Gebhart, 2010; Klinck & Troncy, 2016).

Sensibilisation périphérique

Au cours de la progression de l'arthrose, les tissus endommagés libèrent une mixture de médiateurs inflammatoires et de la douleur. L'interaction entre ceux-ci avec les nocicepteurs environnants explique de manière simpliste la mise en place de la sensibilisation de neurones afférents de premier ordre (Lee et al., 2013; Purves et al., 2015b; Schaible, Ebersberger, & Von Banchet, 2002). En fait, la sensibilisation périphérique correspond d'une part à la réduction du seuil de réponse aux stimuli des neurones sensoriels de premier ordre. D'autre part, on observe

également l'amplification de la réponse des nocicepteurs lorsqu'ils sont exposés à des médiateurs inflammatoires et à des dommages tissulaires (Guenther, Reeh, & Kress, 1999; Latremoliere & Woolf, 2009; Pethö, Derow, & Reeh, 2001). Conséquemment, la sensibilisation périphérique est alors restreinte au site endommagé (Latremoliere & Woolf, 2009). En effet, l'inflammation chronique des tissus articulaires induit des changements dans l'environnement chimique des nocicepteurs terminaux ainsi qu'au niveau des neurones nociceptifs eux-mêmes, soit par l'altération de l'expression des canaux ioniques, contribuant à leur propre sensibilisation. Les fibres A δ et les fibres C, dites silencieuses étant donné leur seuil de stimulation élevé en temps normal, expriment plusieurs canaux ioniques et récepteurs au niveau de leurs terminaisons sensorielles (Salaffi et al., 2014). Une certaine proportion de ces neurones primaires afférents présente notamment des récepteurs pour des neuropeptides pro-inflammatoires tels la SP, CGRP et la BK ou encore des récepteurs pour des neuropeptides anti-nociceptifs, telle la STT (Bonnet, 2005; Schaible et al., 2002). La sécrétion des médiateurs inflammatoires par les neurones nociceptifs dans leur propre environnement, soit le phénomène d'inflammation neurogène, de même que la présence de facteurs de croissance neuronaux, contribuent d'autant plus à enrichir l'excitabilité des nocicepteurs par le biais d'une boucle de rétroaction positive (Kandel et al., 2013; Klinck & Troncy, 2016; Salaffi et al., 2014).

Sensibilisation centrale

La présence d'une sensibilisation périphérique persistante telle qu'observée dans l'arthrose correspond en fait en la première phase de la sensibilisation centrale (Fusco et al., 2017). La relâche de médiateurs inflammatoires suivant l'activation des nocicepteurs présents dans les articulations entraîne une activité neuronale augmentée à la périphérie (Klinck & Troncy, 2016). Cette hyperexcitabilité neuronale mène ainsi au relâchement excessif de neurotransmetteurs, non seulement aux extrémités périphériques, mais également à celles faisant synapse au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Fusco et al., 2017; Hunter, McDougall, & Keefe, 2008; Kandel et al., 2013; Klinck & Troncy, 2016; Lorenz et al., 2011).

L'activation répétitive à basse fréquence des fibres afférentes nociceptives entraîne progressivement une augmentation de la fréquence de décharge des neurones de la corne dorsale. Ceci est alors suivi d'une hausse du niveau de transfert de l'information douloureuse

des neurones de la corne dorsale au cortex somatosensoriel (Purves et al., 2015b). Ce processus nommé « *wind-up* » impliquerait les récepteurs de type NMDA du glutamate, et mènerait vraisemblablement à une hyperactivité au niveau du système nerveux central qui contribuerait notamment à la caractéristique persistante de la douleur chronique (Kandel et al., 2013; Lorenz et al., 2011). Du coup, une potentialisation à long terme au niveau synaptique entre les terminaisons des fibres C et les neurones se projetant vers le cerveau survient généralement dans les cas de sensibilisation prolongée. Ce phénomène impliquant des mécanismes tant pré- que post-synaptiques augmente la probabilité de relâche de neurotransmetteurs au niveau présynaptique par les fibres C. D'un point de vue neurophysiologique, cette activation accrue se traduit par une augmentation du champ de réception des signaux (sommation spatiale), ainsi que par un seuil d'activation diminué et une dépolarisation prolongée (sommation temporelle). D'ailleurs, ceci est une caractéristique importante contribuant au phénomène de sensibilisation centrale (Kandel et al., 2013; Kuner & Flor, 2016). Par ailleurs, la connectivité synaptique étant un phénomène dynamique, les changements dans l'environnement de la corne dorsale de la moelle épinière engendrent des modifications atteignant l'aspect structurel et fonctionnel de la synapse (Arendt-Nielsen, 2017; Hunter et al., 2008; Kuner & Flor, 2016; Purves et al., 2015b; Woolf, 1983). On parle alors du phénomène de plasticité synaptique, soit des changements au niveau des synapses qui dépendent de la présence d'activité neuronale à la synapse (Arendt-Nielsen, 2017; Hunter et al., 2008; Kuner & Flor, 2016). Au départ, des modifications post-transcriptionnelles de protéines et des changements dans le trafic des récepteurs du glutamate contribuent à altérer la transmission synaptique. Plus tardivement, des altérations durables de la transmission synaptique ainsi que des effets sur la croissance synaptique peuvent être attribués à des changements dans l'expression des gènes (Purves et al., 2015b). Tous ces changements centraux entraînent d'autant plus une généralisation de la sensibilisation aux fibres afférentes provenant des mécanorécepteurs de bas seuil (c.-à-d. fibres A β) (Klinck & Troncy, 2016; Latremoliere & Woolf, 2009; Purves et al., 2015b). Ainsi, ces fibres qui en temps normal, peuvent ou non être impliquées dans la nociception acquièrent la capacité de transmettre les signaux de douleur et activer les neurones de la corne dorsale (Klinck & Troncy, 2016; Latremoliere & Woolf, 2009; Purves et al., 2015b). C'est alors que des stimuli non nociceptifs se trouvent à générer des sensations douloureuses. Ce phénomène se nomme notamment allodynie (Purves et al., 2015b). L'activation spontanée de nocicepteurs ou encore, l'effet de

sommation temporelle de stimuli de basse fréquence peuvent alors générer une réponse de plus en plus intense et persistante (Klinck & Troncy, 2016; Lorenz et al., 2011).

Enfin, les changements neurophysiologiques produits dans des conditions inflammatoires, telles qu'observées dans l'arthrose, mèneront aux phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale. Éventuellement, au cours de l'établissement de la sensibilisation centrale, il apparaît des changements au niveau de l'excitabilité membranaire, une modulation de l'efficacité synaptique et/ou une altération des mécanismes d'inhibition de la douleur (Klinck & Troncy, 2016; Latremoliere & Woolf, 2009). Finalement, le résultat de cette sensibilisation s'observera par le développement d'hyperalgésie, soit une réponse douloureuse exagérée à un stimulus nociceptif quelconque et d'allodynie, soit une réponse douloureuse à un stimulus normalement non nocif (Mease et al., 2011; Schaible et al., 2002).

2. Modèles expérimentaux

La complexité des processus et multiples mécanismes impliqués dans la pathologie de l'arthrose, ainsi que les difficultés rencontrées dans la conception de traitements sécuritaires et efficaces pour les patients souffrants de douleurs chroniques représentent des défis majeurs en recherche. Du coup, les modèles expérimentaux utilisés dans ce domaine d'étude doivent être réalisés avec grande vigilance si l'on veut reproduire adéquatement la maladie (Brown, 2017). Ces modèles sont importants, car les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement et la progression de l'arthrose ne sont que partiellement compris. D'autant plus à ce jour, aucune intervention ne permet de ralentir la progression de la maladie ou de réparer les dommages articulaires (Chen et al., 2017; Lascelles et al., 2018). Évidemment, les modèles cellulaires et moléculaires permettent de comprendre certains phénomènes de manière isolée cependant, seuls les modèles *in vivo* permettent d'étudier l'interaction des diverses composantes de la maladie et la réponse de l'organisme dans son ensemble.

Pour le moment, les modèles précliniques du domaine de la douleur chronique, incluant l'arthrose, présentent des difficultés au niveau de la translation vers la clinique des résultats obtenus en laboratoire. Cette problématique s'observe d'ailleurs tant vers les animaux de compagnie atteints d'arthrose naturelle que vers les humains. Certains ont du coup suggéré que

ces échecs translationnels rencontrés seraient dus à diverses lacunes se trouvant dans les protocoles d'essais cliniques (Mogil, 2017; van der Worp et al., 2010).

2.1. Caractéristiques recherchées d'un modèle animal d'arthrose

La compréhension des mécanismes impliqués dans la maladie, la mise en place de méthodes de détection précoce, le développement de stratégies d'intervention pour ralentir la progression de la maladie, ainsi que le traitement de l'arthrose et le contrôle de la douleur sont les éléments principalement visés par la recherche (Brown, 2017; Gregory et al., 2012). La recherche translationnelle peut être considérée comme étant critique pour la compréhension des processus d'établissement de la pathologie et pour la découverte de moyens atténuant ses effets à long terme. D'autant plus, les modèles animaux utilisés doivent permettre une transposition rapide et efficace des observations expérimentales vers des applications qui augmentent la santé et le bien-être des patients humains ou animaux en clinique (Gregory et al., 2012; Moreau et al., 2013). Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle animal se doit d'être choisie avec souci d'une utilisation appropriée et éthique des animaux lors de la conception d'une étude. Ainsi, le principe des « 3 Rs » (**R**éduire le nombre d'animaux utilisés, **R**affiner les procédures et protocoles pour minimiser la souffrance et maximiser la valeur des résultats, et lorsque possible **R**emplacer le modèle animal par une approche alternative) devrait être appliqué dans les études requérant l'utilisation d'animaux (Little & Zaki, 2012; Mogil, Davis, & Derbyshire, 2010).

Il est évident qu'un modèle animal réalisé en laboratoire ne présentera jamais exactement l'ensemble des caractéristiques observées chez le patient animal en clinique, et encore moins chez le patient humain. Pour le moment, les différents modèles ont chacun leurs forces et faiblesses en ce qui concerne la reproduction des processus pathologiques impliqués dans l'arthrose. Ainsi, selon le modèle choisi il est possible de mieux reproduire certains aspects de la pathologie et par comparaison, les différents mécanismes moléculaires et neuronaux associés à la douleur pouvant y être liés (Malfait & Schnitzer, 2013). En fait, ces modèles devraient permettre de caractériser précisément des phénomènes neurochimiques et anatomiques. Par ailleurs, le cadre expérimental dans lequel les modèles animaux sont utilisés doit prendre en compte la génétique et l'environnement, la valeur économique et l'aspect sécuritaire. Les études dont le prélèvement et l'isolement de molécules (p. ex. l'ARN messager) sont nécessaires, tirent

également avantage à utiliser ces modèles puisqu'ils permettent de récolter à partir des tissus ces molécules qui normalement ne seraient pas (ou très difficilement) possibles d'obtenir chez un patient en clinique (Mogil et al., 2010).

La nociception entraînée par un modèle expérimental de douleur convenable devrait être reproduite par les mécanismes impliqués dans la condition clinique étudiée. Parallèlement, les mesures de la douleur devraient détecter les réponses s'apparentant à de la douleur, mais également toute composante liée à l'expérience clinique de la douleur par exemple, l'impact de la maladie sur la qualité de vie (Gregory et al., 2013). Ainsi, le modèle expérimental idéal devrait reproduire le plus fidèlement possible ce qui se produit réellement dans la pathologie naturelle, incluant les processus moléculaires et mécanismes de nociception ainsi que l'atteinte fonctionnelle (Gregory et al., 2012; Lascelles et al., 2018). Évidemment, les animaux ne pourront jamais énoncer l'expérience subjective qui survient dans les conditions de douleur chronique, mais la subjectivité présentée chez l'humain peut être associée à des mesures objectives. Ainsi, plus les évaluations et mesures réalisées sur les modèles animaux sont objectives, plus il est possible de se rapprocher de la condition naturelle (Mogil et al., 2010).

2.2. Modèles animaux d'arthrose et méthodes d'induction

Puisque l'arthrose est maintenant considérée comme un regroupement de différents phénotypes de maladies partageant certaines caractéristiques cliniques et pathologiques, le choix d'un modèle animal « approprié » dépend principalement du type d'arthrose d'intérêt pour une étude. En effet, la cause et le mécanisme ayant initié la pathologie (post-traumatique, association avec l'âge, métabolique ou génétique), les tissus affectés (cartilages, os, synovie/membrane synoviale, atrophie musculaire), la progression (stade et vitesse d'évolution) et les symptômes (douleur, atteintes fonctionnelles) sont différents aspects à considérer lors de la planification d'un modèle d'arthrose (Malfait & Little, 2015). En choisissant le modèle en fonction de l'aspect de la pathologie d'intérêt pour l'étude en question, il est possible d'obtenir des résultats avec une validité supérieure.

Dans le domaine de recherche ciblant l'étude de l'arthrose, plus d'une vingtaine de méthodes d'induction de l'arthrose seraient utilisées, et ce, sur une dizaine d'espèces animales différentes provenant chacune de diverses lignées, d'âges variables et de sexes différents (Little

& Zaki, 2012). Les petits animaux de laboratoire (souris, rat, lapin et cochon d'Inde) sont principalement utilisés pour l'étude de la pathogénie et la physiopathologie des processus de la maladie, entre autres puisqu'ils sont relativement plus économiques, plus rapides et moins complexes à réaliser que des études réalisées sur de plus grands animaux. Ces petits animaux sont ainsi utiles dans des études de type exploratoire, et représentent des préalables à tout essai clinique de traitement. Cependant, ils n'offrent généralement pas une bonne translation au niveau clinique. Les grands animaux ou animaux de compagnie (chien, mouton/chèvre, cheval) sont également utilisés pour étudier les processus pathologiques de la maladie et le développement de traitements. Ces modèles animaux présentent évidemment l'avantage d'avoir une anatomie plus similaire à celles des humains ou autres animaux naturellement atteints d'arthrose. De plus, certains aspects du développement de la maladie sont plus représentatifs de la réalité clinique (Kuyinu et al., 2016). Les principaux modèles animaux d'arthrose peuvent être divisés en deux catégories : les premiers reproduisant l'arthrose dite primaire (idiopathique) où l'arthrose survient spontanément (naturellement ou par des modifications génétiques), et les seconds, où l'arthrose secondaire est reproduite par diverses méthodes d'induction (chirurgicalement ou par l'injection intra-articulaire d'un composé chimique) (Kuyinu et al., 2016; McCoy, 2015). Par ailleurs, la combinaison de deux types de modèles ou encore l'utilisation de deux modèles dans une étude sont des alternatives qui selon certains pourraient permettre de mieux refléter la condition chez l'humain (Gervais et al., 2019; Moreau et al., 2013).

2.2.1. Modèles d'arthrose spontanés

Chez les chiens et les chats, l'arthrose peut survenir naturellement, de manière progressive de manière relativement semblable à chez l'Homme. Cette population d'animaux représente alors un modèle d'arthrose d'intérêt pouvant être transposé à l'humain, ayant non seulement l'avantage de présenter les mécanismes exacts qui surviennent dans l'établissement de l'arthrose, mais étant également sujet au même environnement et aux mêmes comorbidités que l'humain (Lascelles et al., 2018). Bien que ces modèles soient plus longs à développer que des modèles induits et inévitablement plus coûteux (Kuyinu et al., 2016; McCoy, 2015), la progression de l'arthrose est souvent significativement plus rapide que chez l'humain et le processus de dégénération intra-articulaire est décrit de manière détaillée. Ceci permet

notamment d'observer l'histoire naturelle de la pathologie dans un délai relativement rapide (Lascelles et al., 2018; Pascual-Garrido et al., 2017). Cependant, tel que constaté chez l'Homme, la présentation de la pathologie naturelle est variable entre chaque individu et cet aspect complexifie l'analyse des résultats en recherche (McCoy, 2015). Néanmoins, les conditions de telles études se rapprochent des études pharmacologiques populationnelles qui intègrent de manière intéressante les influences génomiques et environnementales influençant la maladie, tout en fournissant d'importantes informations en ce qui a trait à la neurobiologie de la douleur dans des conditions d'arthrose naturelle (Lascelles et al., 2018).

Pour ce qui est des modèles d'arthrose de souris modifiées génétiquement, plus d'une centaine de lignées ont été étudiées jusqu'à maintenant (McCoy, 2015). La manipulation génétique des animaux permet l'étude de gènes spécifiques dans ces modèles, ceci peut être avantageux pour la caractérisation de la pathologie en contribuant de manière importante à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation et la progression de l'arthrose (Kuyinu et al., 2016; Little & Zaki, 2012; McCoy, 2015). Toutefois, l'arthrose est généralement décrite comme une maladie polygénique, ce modèle présente ainsi la limite de ne reproduire qu'une seule composante de la maladie (Kuyinu et al., 2016; McCoy, 2015). De plus, ces modèles ne permettent évidemment pas de reproduire l'hétérogénéité interindividuelle constatée dans l'arthrose naturelle (Lascelles et al., 2018).

2.2.2. Modèles induits

Modèles chimiques

Les modèles induits ont été développés afin d'obtenir une meilleure répétabilité des résultats ainsi qu'une progression plus rapide de la maladie, tout en visant à reproduire de manière fidèle les processus pathologiques qui surviennent lors du développement naturel de l'arthrose. Les modèles induits chimiquement altèrent l'homéostasie de l'articulation ce qui mène à la destruction des structures articulaires et éventuellement au développement de l'arthrose (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014). Le modèle d'induction de douleur arthrosique le plus populaire est réalisé par l'injection intra-articulaire de mono-iodoacétate de sodium (MIA) (Malfait & Little, 2015; Otis et al., 2016). En effet, en 2012 le nombre d'études utilisant ce modèle d'induction correspondait à 50% des études sur la douleur arthrosique, alors

que 17% des autres études utilisaient d'autres méthodes d'induction chimique (c.-à-d. l'injection intra-articulaire de carragénine/kaoline, l'adjuvant de Freud ou l'urate de sodium) (Little & Zaki, 2012).

Le modèle MIA étant parfois considéré comme modèle de référence, ou « *gold standard* » de l'étude de la douleur arthrosique, se doit d'être décrit ici plus en détail. Cette substance chimique agit comme un inhibiteur métabolique qui affecte la glycolyse aérobie dans les chondrocytes *via* l'inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, entraînant par le fait même la mort de ces cellules (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014). Ainsi, cet agent chimique permet de diminuer le nombre de chondrocytes, entraînant ainsi des lésions histologiques et morphologiques au niveau articulaire qui sont en partie similaires à celles observées chez le patient arthrosique humain (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014). En revanche, le développement de l'arthrose et de la douleur surviennent très rapidement dans le modèle MIA (Eitner et al., 2017; O'Brien, Philpott, & McDougall, 2017). En effet, en plus de la dégénération articulaire et de la douleur, l'injection intra-articulaire génère rapidement un état inflammatoire aigu et transitoire comparable aux poussées inflammatoires observées chez le patient arthrosique humain. Suivant les 5-7 jours post-injection l'inflammation persiste, mais à un moindre niveau. Ces poussées inflammatoires qui surviennent au tout début contribueraient à la dégénération de l'articulation, ainsi qu'à l'endommagement des nerfs innervant l'articulation pour alors mener à un état de douleur chronique (O'Brien et al., 2017). Ce modèle peut être reproduit chez plusieurs espèces, dont la souris, le rat, le cochon d'Inde, le chien et le cheval (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014). Chez le rat, ce modèle est particulièrement bien établi et reproduit non seulement des lésions histologiques qui ressemblent à celles présentes chez l'humain, mais également des comportements de douleur s'apparentant à ceux exprimés par l'humain, par exemple de l'hyperalgésie mécanique persistante (Eitner et al., 2017; Lampropoulou-Adamidou et al., 2014). De plus, il a été démontré qu'une augmentation de l'expression de neuropeptides était présente notamment pour le modèle MIA chez le rat, témoignant ainsi de la mise en place d'une sensibilisation centrale (Otis et al., 2016; Otis et al., 2017; Otis et al., 2019). Ainsi, le modèle MIA semble idéal pour induire des changements structuraux et une douleur comparables à ce qui s'observe dans l'arthrose chez l'humain. Ces atteintes s'accompagnant par ailleurs d'une neuropathie périphérique et de changements au

niveau du système nerveux central. Toutefois, la pathogenèse induite par le modèle MIA diffère grandement de ce qui est observé dans l'arthrose et ceci représente une limitation importante de ce modèle (Gervais et al., 2019; Little & Zaki, 2012; O'Brien et al., 2017). Il est d'autant plus important de considérer que ce modèle entraîne des changements temporaires d'une durée relativement courte, ce qui peut limiter son utilisation pour certaines études, notamment celles visant à étudier l'effet de substances analgésiques ou d'agents modifiant le cours de la maladie (Gervais et al., 2019).

Globalement, les modèles d'induction chimique de l'arthrose semblent contribuer grandement à l'étude mécanistique de la douleur arthrosique. Cependant, le manque de validité ou de fidélité dans la reproduction de la pathologie naturelle de ces modèles précliniques entraînerait certaines difficultés dans la recherche d'agents analgésiques (Lascelles et al., 2018).

Modèles chirurgicaux d'instabilité articulaire

Les modèles chirurgicaux d'induction de l'arthrose peuvent être réalisés par plusieurs chirurgies ou combinaisons de chirurgies. Cependant, tous visent à produire une instabilité articulaire qui altère éventuellement la répartition des charges sur l'articulation et mène au développement d'arthrose et de douleur, suite à la dégradation du cartilage et au remodelage osseux (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014; O'Brien et al., 2017). Dans les dernières années, c'est environ le quart des études qui utilisaient ce modèle pour induire l'arthrose et la douleur y étant associée (Little & Zaki, 2012). Ces modèles sont principalement réalisés chez le mouton, le chien, le lapin, le rat et la souris, et permettent de reproduire la progression de l'arthrose post-traumatique, mimant généralement bien les changements structuraux et l'atteinte fonctionnelle observés dans l'arthrose chez l'humain (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014; Moreau et al., 2013; O'Brien et al., 2017).

Les chirurgies couramment réalisées pour induire l'arthrose sont la transection du ménisque médial, la déstabilisation du ménisque médial (DMM), la ménisectomie complète ou partielle, la dissection du ligament collatéral médial et la transection du ligament croisé crânial (CCLT) (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014; Little & Zaki, 2012; O'Brien et al., 2017). Lors de l'utilisation des modèles induits chirurgicalement, il est important de prendre en compte que chaque chirurgie produit des changements biomécaniques et cinétiques différents. D'autant

plus, des différences au niveau de la vitesse et des sites de progression de l'arthrose sont non négligeables, et doivent être considérés lorsque les résultats expérimentaux sont comparés à ceux obtenus chez l'humain (O'Brien et al., 2017). Dans une étude récente, il a été trouvé que la combinaison des chirurgies DMM et CCLT (DMM-CCLT) chez le rat permettait d'induire l'arthrose plus progressivement et de manière plus persistante que le modèle chimique MIA, ce qui conséquemment augmenterait le niveau de validité dans la reproduction de l'arthrose post-traumatique (Gervais et al., 2019). En effet, dans ce modèle, les premiers signes d'hyperalgésie apparaissent seulement après quelques semaines en ce qui concerne les modèles chirurgicaux (Eitner et al., 2017). Il a d'autant plus été suggéré que les animaux subissant ces chirurgies développeraient des changements neurophysiologiques quantifiables (Gervais et al., 2019). D'ailleurs, diverses analyses fonctionnelles ont permis d'observer le développement d'asymétrie au niveau de la distribution de leur poids ainsi que de l'allodynie mécanique (Eitner et al., 2017; Gervais et al., 2019). Une altération dans l'expression des neuropeptides comparables à celle obtenue dans le modèle MIA a également été démontrée en ce qui concerne le modèle DMM-CCLT (Gervais et al., 2019).

Bien que l'induction de l'arthrose *via* la genèse d'une instabilité articulaire par une méthode chirurgicale diffère à certains niveaux de l'arthrose naturelle pouvant être observée chez l'animal de compagnie (chiens et chats) et chez l'humain, les modèles chirurgicaux permettent l'obtention de résultats standardisés, étant pratiquement non affectés par l'environnement. Ainsi, ces modèles peuvent être ultimement combinés à un modèle animal d'arthrose naturelle afin de permettre une meilleure caractérisation des essais précliniques (Moreau et al., 2013).

3. Mesures de douleur arthrosique

Il a été suggéré que la problématique observée en ce qui concerne la translation des études précliniques vers la réalité en clinique serait entre autres due à la déficience des méthodes d'évaluation de la douleur dans les modèles animaux (Gregory et al., 2013; Mogil et al., 2010). En revanche, dans l'optique d'augmenter la validité des modèles animaux, différents types d'évaluation ont été développés chez les diverses espèces utilisées dans les modèles de douleur arthrosique (Kuyinu et al., 2016; Little & Zaki, 2012). En effet, des techniques comme l'imagerie, l'histopathologie, la mesure de biomarqueurs, de même que des mesures

biomécaniques et d'évaluation fonctionnelle de la douleur se sont avérées relativement efficaces pour étudier la pathologie de l'arthrose (Kuyinu et al., 2016). Alors que certaines études n'utilisent qu'une seule évaluation de douleur, d'autres en utiliseraient jusqu'à cinq (Little & Zaki, 2012). Or, sachant que la douleur est une sensation multifactorielle, plusieurs évaluations mesurant différentes composantes de la douleur devraient être réalisées afin de caractériser l'expérience de douleur avec une fiabilité supérieure (Arendt-Nielsen et al., 2015; Boyce-Rustay et al., 2010; Gregory et al., 2013). Ces mesures fonctionnelles de douleur incluent notamment, l'évaluation de l'activité locomotrice spontanée, la démarche, l'endurance locomotrice, l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique et thermique aux niveaux ipsi- et contralatéral, ainsi que l'évaluation de l'activité des nerfs afférents au niveau des articulations qui est réalisée de manière spontanée ou évoquée (Little & Zaki, 2012).

3.1. Évaluations structurelles et histopathologiques

3.1.1. Radiographie

Chez l'Homme, l'arthrose peut être définie pathologiquement, radiographiquement ou cliniquement. Or, la radiographie est la méthode standard utilisée pour montrer la présence et la sévérité de l'arthrose avec l'utilisation de divers systèmes de gradation (Kellgren-Lawrence, scores de classification OARSI, WOMAC, etc.) (Johnson & Hunter, 2014; Kuyinu et al., 2016). La radiographie permet de visualiser la largeur de l'espace articulaire (JSW, pour *Joint Space Width*) et la formation d'ostéophytes (qui est bien moindre chez l'Homme que chez le chien), cependant puisqu'elle ne permet pas la visualisation du cartilage et des autres tissus mous, elle ne peut que démontrer des stades avancés de la maladie (Kuyinu et al., 2016). De plus, l'arthrose symptomatique est définie par la présence d'arthrose radiographique en concomitance avec des symptômes attribués à l'arthrose. Cependant, ce ne sont pas tous les individus présentant de l'arthrose radiographique qui démontrent ces symptômes. Il a également été souvent rapporté que la corrélation entre les images radiographiques et la douleur était faible (Fu et al., 2018; Johnson & Hunter, 2014). D'ailleurs, Bedson et Croft ont déterminé, par une revue systématique de la littérature réalisée chez l'humain, que la proportion d'individus souffrant de douleur au genou, chez qui la présence d'arthrose radiographique était confirmée, variait de 15% à 76%, alors que dans la situation inverse, la proportion d'individus atteints d'arthrose radiographique

qui présentaient de la douleur était de 15 à 81% (Bedson & Croft, 2008). De manière similaire, l'arthrose chez les animaux de compagnie (chiens et chats) est diagnostiquée par la corrélation de l'histoire, l'examen physique et les trouvailles radiographiques (Beale, 2005). Or, tel que chez l'humain, le lien entre la douleur et les changements structuraux spécifiques qui s'observent à la radiographie n'est pas établi dans les divers modèles animaux (Malfait & Little, 2015).

3.1.2. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une méthode alternative à la radiographie qui, contrairement à cette dernière, permet de visualiser le cartilage, les ménisques, les ligaments, la membrane synoviale, les lésions de moelle osseuse, et certains marqueurs biochimiques pertinents dans l'arthrose (Kuyinu et al., 2016). Considérant que l'arthrose est une pathologie affectant l'ensemble des tissus articulaires et que l'IRM permet de mieux visualiser les changements structuraux, cette méthode pourrait permettre de détecter l'arthrose à des stades plus précoces et d'avoir une meilleure corrélation entre les changements structuraux et la douleur (Johnson & Hunter, 2014; Neogi, 2017). D'ailleurs, le degré d'inflammation et d'épaississement de la membrane synoviale serait associé au niveau de sévérité de la douleur ressentie chez les patients arthrosiques humains (Eitner et al., 2017; Hunter et al., 2008; Johnson & Hunter, 2014).

3.1.3. Histopathologie

L'histopathologie est considérée comme étant le « *gold standard* » pour évaluer l'arthrose dans les modèles animaux (Kuyinu et al., 2016; McCoy, 2015). Certains systèmes de classification sont plus couramment utilisés (*Mankin score*, *modified-Mankin*, *O'Driscoll score*, *modified O'Driscoll score*, OARSI), mais tous permettent de caractériser la pathogenèse structurelle au niveau microscopique dans les divers modèles employés (Gerwin, Bendele, Glasson, & Carlson, 2010; Kuyinu et al., 2016). L'histopathologie permet également une certaine compréhension de l'effet de certains gènes sur les tissus articulaires. Néanmoins, tout comme il a été déterminé pour les procédures d'imagerie, l'association entre la douleur et les changements structuraux au niveau articulaire qui surviennent dans l'arthrose n'a pu être clairement étudiée à ce jour. Ceci est notamment dû au manque de standardisation dans la

quantification des mesures et à la normalisation de celles-ci entre chaque espèce et modèle animal (Malfait & Little, 2015).

3.2. Analyses fonctionnelles de douleur

Parmi les modèles animaux de douleur arthrosique, **le rat** est couramment utilisé. Les analyses fonctionnelles de douleur discutée dans la section suivante seront donc décrites en regard de cette espèce. Généralement, ces évaluations impliquent la détermination d'un seuil de réponse ou d'une durée de latence en réponse à un stimulus déplaisant croissant ou continu, par exemple le seuil de retrait d'un membre. Le développement de tests sensoriels quantitatifs (QST, pour *Quantitative Sensory Test*), validés tant chez l'Homme que chez l'animal, permet d'ailleurs une analyse relativement performante en ce qui concerne la neurophysiologie de la douleur et le degré de sensibilisation en particulier. Certaines évaluations, notamment les tests opérants, peuvent par ailleurs souligner plus précisément les caractéristiques d'une douleur clinique dans un modèle expérimental, notamment la douleur spontanée et les changements affectifs, motivationnels et fonctionnels, puisque ces tests poussent l'animal à prendre une décision consciente face à leur douleur. Ces évaluations sont typiquement moins réalisées en raison de leur plus grande complexité, dont la nécessité d'entraîner l'animal au préalable et le temps requis pour leur réalisation. Ces évaluations sont toutefois tout de même parfois utilisées et de plus en plus populaires (Klinck et al., 2017; Otis et al., 2016).

3.2.1. Évaluations comportementales

Les évaluations comportementales, ou encore l'évaluation des réponses opérantes, sont généralement des mesures plus subjectives de la douleur. En revanche, ces comportements volontaires ou provoqués sont pertinents dans la mise en évidence de l'intégration de la nociception au niveau central. En effet, les évaluations basées sur les réponses réflexes (p. ex. le tressaillement cutané ou le retrait d'une patte en réponse à une stimulation nocive aiguë) sont parfois considérées comme insuffisantes pour conclure à la présence de douleur. Ainsi, des comportements comme l'éloignement d'une source de stimulation déplaisante, le pivot de la tête vers un site de stimulation sur une région du corps ou diverses formes de vocalisation ne sont que quelques exemples de comportements qui indiquent que le stimulus nociceptif est intégré à de plus hauts niveaux dans le système nerveux central (Klinck & Troncy, 2016). Une

panoplie d'évaluations comportementales sont utilisées dans les études employant différents modèles animaux permettant ainsi de quantifier les réponses comportementales en incluant plusieurs composantes de la douleur, comme les changements cognitifs et affectifs (Otis et al., 2016). Le paradigme du comportement d'échappement/évitement (PEAP, pour *Place Escape/Avoidance Paradigm*), les échelles de grimaces/expressions faciales et l'observation de l'activité et de comportements stéréotypés, telle l'activité d'exploration, ne sont qu'une énumération très limitée des analyses comportementales ayant été développées chez le rat (Deuis, Dvorakova, & Vetter, 2017; Gregory et al., 2013; Tappe-Theodor & Kuner, 2014; Zhang, Zhang, Hu, & Xu, 2011).

Le PEAP est une évaluation qui repose sur la motivation à échapper à un stimulus nocif. Celle-ci inclut notamment les aspects affectif et motivationnel du soulagement de la douleur (Tappe-Theodor & Kuner, 2014). Le test veut que les animaux soient placés sur un grillage dans une cage de Plexiglas où la moitié de la cage est tapissée de noir (côté sombre) alors que l'autre moitié est laissée transparente ou tapissée de blanc (côté lumineux) (Tappe-Theodor & Kuner, 2014; Zhang et al., 2011). Suite à une période sans restriction de mouvement de 30-min dans la cage, les animaux sont stimulés par l'application d'un filament de von Frey au niveau de la surface plantaire à une intensité nociceptive toutes les 15 secondes. Le stimulus est infligé soit sur le membre potentiellement douloureux si l'animal est du côté sombre de la cage, soit sur le membre contralatéral s'il se trouve du côté lumineux (Tappe-Theodor & Kuner, 2014). Avec le temps, l'animal évitera le côté où la stimulation engendre le plus de désagrément (Tappe-Theodor & Kuner, 2014; Zhang et al., 2011). L'animal qui ressent davantage d'inconfort ou de nociception au membre lésé restera du côté lumineux malgré la préférence naturelle des rats pour les endroits sombres (Zhang et al., 2011).

Les échelles d'expression faciales constituent des méthodes d'évaluation de la douleur spontanée visant à augmenter la validité clinique des modèles animaux de douleur (Deuis et al., 2017). Ces échelles récemment développées sont à ce jour disponibles non seulement chez la souris et le rat, mais aussi pour plusieurs autres espèces incluant le porc, le mouton et le cheval (Deuis et al., 2017). La *Rat Grimace Scale* (RGS) comprend quatre unités d'action faciale (contraction orbitale, apparence des joues/nez, position des oreilles et des moustaches) qui sont comptabilisées par un observateur en utilisant des images de l'animal immobile (Leung, Zhang,

& Pang, 2016). La RGS est maintenant validée en tant qu'évaluation de douleur et démontre beaucoup de potentiel dans l'étude de la douleur. Cependant cette analyse demande pour le moment des ressources et du temps ainsi, certains travaillent actuellement à automatiser la procédure, ce qui la rendra d'autant plus utile (Deuis et al., 2017; Leung et al., 2016).

La reconnaissance de la douleur peut être basée, soit sur l'observation de nouveaux comportements anormaux, soit sur la disparition de comportements normaux (Klinck & Troncy, 2016). Ainsi, chez le rat, la mesure de l'activité normale d'exploration spontanée est l'un des comportements permettant l'évaluation d'une douleur chronique (Piel, Kroin, van Wijnen, Kc, & Im, 2014; Wodarski et al., 2016). La quantification de l'observation des comportements normaux ou anormaux des rongeurs peut également être réalisée via le *Labaratory Animal Behavior Observation Registration and Analysis Système* (LABORAS) qui analyse les forces engendrées par le mouvement de l'animal. En fait, un programme informatique reconnaît divers patrons de mouvements, celui-ci détermine et quantifie ensuite les comportements qui auraient pu être modifiés par la douleur arthrosique. Ceci inclut par exemple, le léchage d'un membre lésé, le grattage, la locomotion, la prise d'aliments, le toilettage et plusieurs autres opérations. Le LABORAS, permet également de déterminer et quantifier la position de l'animal incluant sa position (X, Y) et la distribution de sa position dans la cage, la vitesse de ses déplacements et la distance parcourue (Piel et al., 2014).

3.2.2. Évaluations de la distribution pondérale du poids et de la démarche

La perte de fonction et la douleur chez les patients arthrosiques se traduisent par une altération biomécanique et cinétique. Ainsi, chez des animaux atteints d'arthrose, l'analyse de la distribution pondérale du poids sur les membres permet l'évaluation de la fonction articulaire en réponse à une douleur spontanée (O'Brien et al., 2017). Les changements de distribution du poids appliqué sur les membres pelviens peuvent être mesurés par une approche statique, dynamique ou cinétique. Une distribution inégale de la répartition du poids des membres pourrait alors être associée avec de la nociception accrue due à l'arthrose affectant un membre.

Le *Static Weight Bearing* (SWB) permet d'évaluer chez le rongeur la présence de douleur aux membres pelviens alors que l'animal est en position statique. L'évaluation requiert l'utilisation d'un appareil (*Incapacitance meter*TM ou *Incapacitance Tester*TM) qui comprend

une chambre de Plexiglas où l'animal est placé en position inclinée, alors que chacun de ses membres pelviens repose sur une plaque de force indépendante, pendant que ses membres thoraciques reposent sur la vitre de Plexiglas (Deuis et al., 2017; O'Brien et al., 2017). L'animal doit alors se tenir sur ses membres postérieurs et la force moyenne appliquée sur chacune de celles-ci est mesurée sur une période d'environ 3 secondes par l'appareil. La distribution du poids inégale entre les deux membres pelviens reflète un ajustement naturel selon le niveau de nociception ressentie (Deuis et al., 2017). Bien que ce test soit objectif et qu'il ait démontré une bonne reproductibilité dans plusieurs modèles de douleurs et un niveau de détection de nociception comparable à l'approche alternative dynamique (Bove et al., 2003; Deuis et al., 2017; O'Brien et al., 2017; Schött et al., 1994), le fait de devoir restreindre l'animal pourrait biaiser les résultats, puisque l'animal subit un stress important qui pourrait entraîner une certaine analgésie (Tappe-Theodor & Kuner, 2014).

Le *Dynamic Weight Bearing* (DWB) permet plutôt de mesurer de manière dynamique la distribution du poids des membres postérieurs alors que l'animal se déplace librement, éliminant ainsi la nécessité d'entraîner l'animal à rester dans l'*Incapacitance meter*TM, et diminuant d'autant plus l'influence du stress sur la réponse à la douleur (O'Brien et al., 2017). L'animal est donc placé dans une chambre de Plexiglas sur une surface sensible à la pression. Celui-ci est alors libre de s'y déplacer pour une période de 3-4 minutes. Un logiciel combiné à l'enregistrement des mouvements de l'animal par une caméra permet l'analyse du poids appliqué sur chaque membre, ainsi que la surface déposée de chaque patte (O'Brien et al., 2017; Piel et al., 2014). Tout comme le SWB, le DWB a su démontrer une bonne reproductibilité dans plusieurs modèles de douleurs (Deuis et al., 2017; Griffioen et al., 2015; O'Brien et al., 2017; Quadros et al., 2015).

Le *Kinetic Weight Bearing* (KWB) est une analyse de la démarche cinétique de l'animal, qui inclut la distribution du poids appliqué sur ses membres alors qu'il est en mouvement. Cette analyse récemment développée combine l'utilisation d'une caméra, qui enregistre le déplacement, et une plateforme constituée de plusieurs milliers de capteurs qui mesurent le poids appliqué sur chacun des membres. Ainsi, l'animal se déplace en ligne droite sur cette plateforme, traversant un corridor étroit (Bioseb, 2018). Les données recueillies sont ensuite transférées à un ordinateur qui permet l'analyse de plusieurs paramètres tels la longueur de la foulée, l'angle

avec lequel la patte est déposée au sol et la vitesse de l'animal (Bioseb, 2018; O'Brien et al., 2017). Bien que l'analyse de la distribution du poids soit plus complète avec ce type de méthodes, l'interprétation des résultats obtenus se trouve à être plus complexe chez les petits animaux tels les rongeurs. En effet, ceux-ci étant des proies, tendent à cacher leur douleur afin d'éviter d'être repérés par les prédateurs. De plus, il peut être ardu d'y attribuer la véritable cause d'une distribution anormale du poids de l'animal, celle-ci pouvant être due soit à la douleur, soit à un défaut dans la biomécanique de l'articulation (O'Brien et al., 2017).

3.2.3. Tests sensoriels quantitatifs

Les phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie (primaire ou secondaire) ont été associés à l'arthrose tant chez le patient humain que vétérinaire et les QST permettent de mesurer et caractériser ces sensations anormales (Arendt-Nielsen et al., 2015; Briley, Williams, Freire, Griffith, & Lascelles, 2014; Lascelles et al., 2018). Dans les études de douleur utilisant les modèles animaux, l'induction de divers stimulus (mécaniques, thermiques, chimiques, électriques, etc.) permet d'évaluer de manière quantitative le seuil de sensibilité de l'animal en fonction de sa réponse aux stimuli (Lascelles et al., 2018). Ces évaluations sensorielles-réflexes, bien que considérées comme semi-objectives, prennent uniquement en compte la composante sensorielle associée à la douleur, sans considérer les composantes émotionnelles et cognitives (Boyce-Rustay et al., 2010; Briley et al., 2014; Gregory et al., 2013). Malgré le fait que l'expérience de douleur clinique ne soit pas exactement reproduite par ces QST, ils offrent la possibilité d'étudier les mécanismes de douleur en caractérisant les sensations anormales associées à la sensibilisation centrale, rendant ainsi la translation clinique des informations obtenues valide (Arendt-Nielsen et al., 2015; M. Guillot, 2013). De plus, en combinant plusieurs QST ciblant différents mécanismes de douleur (*e.g.* évaluation du seuil de la douleur et de la tolérance à la douleur, réponse à la sommation temporelle, etc.) avec des évaluations fonctionnelles et comportementales de la douleur, l'aspect multidimensionnel de la douleur se voit caractérisé de manière plus juste (Arendt-Nielsen et al., 2015; Boyce-Rustay et al., 2010; LaGraize, Borzan, Peng, & Fuchs, 2006; van der Kam, Vry, Schiene, & Tzschentke, 2008; Wilson, Boyette-Davis, & Fuchs, 2007).

Stimulations thermiques – Hargreaves test

L'allodynie et l'hyperalgésie thermiques sont des phénomènes largement répandus chez les patients humains atteints de douleur chronique focale, alors que la sensibilisation centrale à la douleur est particulièrement apparente lors de la stimulation des nocicepteurs de fibres non myélinisées, soit les fibres C plus particulièrement (Vierck, Acosta-Rua, Nelligan, Tester, & Mauderli, 2002; Vierck, Cannon, Fry, Maixner, & Whitsel, 1997; Vierck, Hansson, & Yeziarski, 2008). Ainsi, les tests de stimulation thermique sont souvent utilisés dans l'évaluation de la sensibilité somato-sensorielle chez les animaux de laboratoire. De plus, contrairement aux tests de stimulations mécaniques, la stimulation thermique nécessite une contention moins importante des animaux (Vierck et al., 2008). Le test de Hargreaves a été développé afin d'offrir une mesure de la sensibilité aux stimuli thermiques plus localisés que les tests employés auparavant (*Tail Flick Test*, *Hot-Plate Test*). Ainsi, il permet de mesurer la sensibilité à la chaleur d'une patte contrôle et d'une patte affectée expérimentalement sur un même animal (Gregory et al., 2013). L'évaluation consiste à placer l'animal dans une cage de plastique avec un sol de verre puis, à l'aide de l'appareil de Hargreaves, une chaleur relativement élevée est appliquée au niveau de la surface plantaire du membre désiré afin d'induire le stimulus douloureux et enfin, le réflexe de retrait (Piel et al., 2014). Bien que l'hyperalgésie thermique soit une mesure fréquemment utilisée dans les études de douleur arthrosique, il a été évoqué suite à diverses études que l'hypersensibilité à la chaleur et/ou au froid n'était pas démontrée dans tous les types de modèles animaux de douleur articulaire (Malfait, 2017; Vierck et al., 2008). Ceci serait notamment attribué au fait que les voies moléculaires et neuronales impliquées dans l'hypersensibilité divergent selon la pathogénie du modèle ainsi qu'avec la progression de la pathologie (Malfait, 2017).

Stimulations mécaniques tactiles – von Frey

Les évaluations fonctionnelles de douleur mesurant la sensibilité mécanique tactile sont fréquemment utilisées pour mesurer l'hyperalgésie et l'allodynie tactiles (Gregory et al., 2013). En effet, la réponse à un stimulus mécanique tactile peut être comparée entre un membre atteint et un membre sain. Ainsi, il est possible de déterminer le niveau d'augmentation d'une réponse à un stimulus normalement nociceptif ou encore la présence d'une réponse nociceptive à un

stimulus non nociceptif, ce qui reflète alors respectivement le degré d'hyperalgésie et/ou d'allodynie mécanique tactile (Gregory et al., 2013; O'Brien et al., 2017). Le test de von Frey est fréquemment utilisé dans les études utilisant les rongeurs afin d'obtenir une mesure quantitative du seuil de sensibilité tactile (O'Brien et al., 2017), on le considère donc comme un test sensoriel quantitatif statique. En fait, ce test permet d'évaluer l'allodynie tactile secondaire, puisque le stimulus est appliqué au niveau d'un site distant à la lésion primaire (le genou), normalement non douloureux (Ferland, Laverty, Beaudry, & Vachon, 2011). Le principe du test consiste à induire le réflexe de retrait en appliquant un stimulus tactile à la surface plantaire des membres postérieurs du rat (O'Brien et al., 2017). Afin d'améliorer la validité du test, une version électronique est maintenant recommandée (Möller, Johansson, & Berge, 1998). Ainsi, l'animal est restreint dans une petite cage surélevée où il se déplace sur une grille de métal et le stimulus est généré à l'aide d'un filament typiquement en nylon. Ce filament est connecté à un appareil électronique permettant de recueillir des informations incluant notamment la force maximale appliquée sur la surface plantaire d'un membre de l'animal. Cette force appliquée est en fait convertie en signal digital et l'appareil présente alors une valeur numérique (Möller et al., 1998). Généralement, les membres postérieurs sont stimulés en alternance et la force maximale appliquée avant que l'animal retire sa patte est utilisée pour comparer les deux membres. D'autres informations, par exemple le temps de latence avant le retrait du membre, peuvent également être enregistrées par le von Frey électronique (O'Brien et al., 2017; Piel et al., 2014). Des résultats similaires démontrant une diminution du seuil de douleur en réponse à un stimulus mécanique tactile peuvent être obtenus en appliquant une pression au niveau des tissus profonds ou encore par le test Randall-Selitto qui mesure plutôt l'hyperalgésie secondaire (Bove et al., 2006; Gregory et al., 2013). Mais ce dernier a démontré de piètres qualités métrologiques, en particulier une très grande variété de réponses sur le même animal, et encore plus entre les animaux (Otis et al., 2016).

Réponse à la sommation temporelle mécanique

L'augmentation de décharges de potentiel d'action des fibres C des neurones de la corne dorsale est engendrée par la répétition à basse fréquence d'un stimulus d'intensité fixe, c'est le phénomène de *wind-up* spinal. Cette facilitation dépendante à l'activité aurait une implication importante dans les changements précoces de sensibilisation centrale qui mènent

éventuellement à des phénomènes chroniques (Arendt-Nielsen, 2017; Fingleton, Smart, Moloney, Fullen, & Doody, 2015; Martin Guillot et al., 2014). Dans des cas de douleur où la source nociceptive se retrouve au niveau périphérique, tel que dans l'arthrose, l'intégration centrale d'influx nociceptifs est d'une importance majeure et peut être mesurée par la sommation temporelle, un QST dynamique (Arendt-Nielsen, 2017). Cette évaluation est en fait indicatrice d'une hyperexcitabilité du système de douleur central, reflétant en quelque sorte une manifestation de l'établissement du *wind-up* spinal. L'amplification de la sommation temporelle est une observation pertinente utilisée lors de l'évaluation de l'excitabilité du système nerveux central, celle-ci peut être évoquée par une variété de stimuli soit mécanique, électrique ou thermique (Arendt-Nielsen, 2017; Martin Guillot et al., 2014). D'ailleurs, Guillot et al. (2014) ont réussi à développer un test sensoriel quantitatif chez le chat arthrosique, où la sommation temporelle est générée par un appareil appliquant des stimuli mécaniques répétitifs chez le chat éveillé. Ce test a ainsi permis de démontrer un phénomène de sommation temporelle amplifié chez les chats arthrosiques en comparaison aux chats sains, permettant ainsi de déterminer la présence du développement d'une sensibilisation centrale chez les chats atteints naturellement d'arthrose (Martin Guillot et al., 2014).

3.3. Analyses de marqueurs physiologiques moléculaires

Le développement de mesures objectives de la douleur arthrosique inclut entre autres la possibilité de quantifier la progression de la pathologie aux niveaux structurel et fonctionnel ainsi qu'au niveau neuronal par la mesure de marqueurs physiologiques et biochimiques (Lotz et al., 2013; Malfait & Little, 2015). Bien que plusieurs biomarqueurs semblent prometteurs, aucun ne présente une spécificité suffisante pour permettre à lui seul le diagnostic, l'évaluation de la sévérité de la maladie, l'établissement d'un pronostic ou encore l'évaluation d'une intervention (Lotz et al., 2013). Cependant, il a été suggéré que leur utilisation pourrait être intégrée à un système de pointage de la douleur arthrosique afin de possiblement augmenter la fiabilité des observations (Klinck & Troncy, 2016; Lotz et al., 2013). Typiquement, la majorité des études se concentrent sur la recherche de biomarqueurs structurels de la pathologie, par exemple des produits de dégradation de la matrice articulaire (Malfait & Little, 2015). Or, l'étude de biomarqueurs plus spécifiques aux phénomènes nociceptifs est d'autant plus d'intérêt pour caractériser la douleur dans l'arthrose. Ainsi, les hormones de stress circulantes

(l'adrénaline plasmatique, la noradrénaline et le cortisol), les endorphines endogènes et certains autres neuropeptides sont d'autant plus considérés comme des biomarqueurs potentiels de la douleur.

L'expression de neuropeptides est notamment impliquée dans la transmission de la douleur par les fibres C peptidergiques, alors qu'ils sont modulateurs de la douleur au niveau des synapses du système nerveux central (Malavolta & Cabral, 2011; Otis et al., 2017). Dans les dernières années, il a été démontré que l'expression de neuropeptides était régulée à la hausse dans le modèle MIA d'arthrose (Ferland, Pailleux, Vachon, & Beaudry, 2011). De plus, cette observation corrélait avec les résultats d'analyses fonctionnelles de la douleur, suggérant l'établissement d'une sensibilisation centrale (Otis et al., 2016; Otis et al., 2017). Très récemment, des changements semblables dans la régulation des neuropeptides ont été décrits dans un modèle chirurgical d'arthrose combinant la rupture du ligament croisé crânial et la déstabilisation du ménisque médial (Gervais et al., 2019). Certains de ces neuropeptides participant à la douleur arthrosique seront décrits plus en détail dans les paragraphes suivants.

3.3.1. Substance P

La substance P (SP) est un peptide de la famille des tachykinines qui se retrouve en concentrations importantes dans l'hippocampe et le néocortex, mais aussi au niveau du tractus gastro-intestinal. La SP est donc classifiée comme étant un peptide cérébro-intestinal. La SP est d'autant plus sécrétée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière par les fibres C, soit des fibres afférentes primaires qui relaient entre autres des signaux de douleur en provenance de la périphérie (Fürst, 1999; Purves et al., 2015b). Ainsi, la SP est relâchée dans la moelle épinière suite à une stimulation nociceptive. De plus, sa concentration serait augmentée par la hausse de l'activité du NGF (Fürst, 1999). Ce neuropeptide se lie préférentiellement au récepteur NK1 puis, suite à la stimulation des fibres nociceptives, il est relâché dans le liquide cébrospinal et au niveau des terminaisons nerveuses périphériques (Fürst, 1999; Schaible et al., 2002). L'augmentation de l'expression de la SP augmente l'effet excitateur d'acides aminés, sensibilise les neurones de la corne dorsale et amplifie la transmission d'influx nociceptifs (Ferland, Pailleux, et al., 2011; Zubrzycka & Janecka, 2000). Aussi, la liaison de la SP à NK-1 est-elle impliquée de manière importante dans l'inflammation neurogène au niveau

périphérique, alors que les récepteurs NK-1 jouent un rôle d'autant plus majeur dans la transmission de la douleur (Fürst, 1999).

Plusieurs études ont d'ailleurs associé ce neuropeptide ainsi que son récepteur NK-1 à la douleur arthrosique. Il a notamment été suggéré que la régulation à la hausse de ceux-ci survenant dans l'arthrose serait associée à la dégradation accélérée de la matrice de cartilage dans le genou (Im et al., 2008). D'autant plus, SP serait un médiateur de l'augmentation de la perméabilité vasculaire par son action sur son récepteur NK-1, et contribuerait ainsi à la formation d'œdème, à l'augmentation de l'apport sanguin et au recrutement de cellules inflammatoires à un niveau local (Ferrell & Russell, 1986). Autrement, le récepteur NK-1 de son côté serait impliqué dans la dépression (Hallberg, 2015), soit un symptôme associé à l'arthrose (Felson, 2009; Warner et al., 2017).

3.3.2. *Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)*

Les neurones peptidergiques de la corne dorsale, qui libèrent le CGRP, innervent plusieurs structures articulaires. Ainsi, ce neuropeptide est impliqué tant dans les mécanismes de sensibilisation nociceptive périphériques, que centraux (Miller, Block, & Malfait, 2017). Au niveau périphérique, le CGRP aurait un rôle important dans la mise en place de l'inflammation neurogène ainsi que d'autres processus associés à la douleur, dont la vasodilatation (Miller et al., 2017; Oku et al., 1987). Au niveau du système nerveux central, le CGRP est impliqué dans les mécanismes de transmission d'influx nociceptifs alors qu'il produit une dépolarisation lente des neurones de la corne dorsale, potentialisant également l'effet dépolarisant du glutamate (Beaudry, Ferland, & Vachon, 2009). Le CGRP amplifie ainsi l'excitabilité du système nerveux central, *via* l'augmentation des niveaux de calcium et l'activation de voies impliquant des seconds messagers (protéines kinases) (Ferland, Beaudry, & Vachon, 2012). Il a également été rapporté que le CGRP amplifierait la relâche de la SP au niveau central par les fibres C, accentuant d'autant plus l'excitabilité des neurones (Oku et al., 1987).

Le CGRP est définitivement un biomarqueur d'intérêt dans l'étude des processus de douleur associés à l'arthrose. D'ailleurs, des études réalisées chez le rat utilisant le modèle MIA d'induction de l'arthrose, et plus récemment une étude utilisant un modèle chirurgical DMM-

CCLT, ont pu corrélérer l'augmentation spinale du CGRP à la présence de douleur évaluée par diverses analyses fonctionnelles (Gervais et al., 2019; Otis et al., 2016; Otis et al., 2017).

3.3.3. Bradykinine

La bradykinine (BK) est un peptide de la famille des kinines qui possède un rôle de neuromodulateur important au niveau périphérique et central. Ce neuropeptide est relâché au site du tissu endommagé et enflammé. Il agit alors sur des récepteurs couplés à la protéine G qui sont présents au niveau des terminaisons périphériques des neurones primaires (Chapman & Dickenson, 1992; Ferreira et al., 2002; Wang et al., 2005). La BK joue un rôle majeur dans la sensibilisation périphérique, puisqu'elle représente un des agents les plus actifs au niveau de la production de la douleur. Ceci serait en partie dû au fait qu'elle active directement les nocicepteurs des fibres A δ et C, en plus d'amplifier la synthèse des prostaglandines par les cellules à proximité (Kandel et al., 2013). Au niveau central, des récepteurs de la BK sont retrouvés au niveau du ganglion de la racine dorsale et de la corne dorsale de la moelle épinière, lui accordant ainsi un rôle de transmission de la douleur (Ferreira et al., 2002; Wang et al., 2005). Les niveaux de BK spinale sont d'autant plus augmentés par l'afférence d'influx nociceptifs dans les fibres A δ et C. Ceci activerait d'ailleurs les récepteurs à la BK qui entraîneraient alors une modulation de la transmission du glutamate dans la corne dorsale, contribuant ainsi à la l'hyperalgésie et l'allodynie secondaires (Kohno et al., 2008; Wang et al., 2005).

3.3.4. Somatostatine

La somatostatine (STT, ou *SST* en anglais) est un peptide qui agit au niveau de plusieurs cibles tissulaires et qui entraîne par le fait même un large éventail de fonctions biologiques (Pinter, Helyes, & Szolcsanyi, 2006). Au niveau du système nerveux, la STT est un neuromodulateur de la douleur généralement reconnu pour son action inhibitrice au niveau central (Pinter et al., 2006; Prasoon et al., 2015). De manière semblable, au niveau périphérique, la STT entraîne une inhibition de la nociception ainsi que des composantes neurogènes des processus inflammatoires (Pinter et al., 2006; Szolcsanyi, Helyes, Oroszi, Németh, & Pinter, 1998; Szolcsanyi, Pinter, Helyes, Oroszi, & Németh, 1998). La STT relâchée par les fibres C des neurones afférents agit au niveau pré-jonctionnel des terminaisons sensorielles-efférentes et possède une grande affinité pour des récepteurs membranaires couplés à la protéine G (Green,

Basbaum, & Levine, 1992; Lahlou et al., 2004; Pinter et al., 2006). Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs de la STT incluant le récepteur sst2A, entraînent l'inhibition des canaux calciques voltages dépendants et l'activation des canaux potassiques à rectification entrante. Ceci résulte alors en une hyperpolarisation neurale et une réduction de la relâche de neurotransmetteurs (Lahlou et al., 2004; Meriney, Gray, & Pilar, 1994; Prasoon et al., 2015).

Les mécanismes d'action de la STT au niveau central sont cependant relativement complexes. Il est d'abord à comprendre que la majorité des informations sensorielles afférentes sont modulées dans une région particulière de la corne dorsale de la moelle épinière, soit la *lamina* II, et qu'à cet endroit, les récepteurs sst2a seraient possiblement exprimés uniquement par des neurones GABAergiques, soit des neurones inhibiteurs (Todd, Spike, & Polgar, 1998; Yasaka, Tiong, Hughes, Riddell, & Todd, 2010). À ce niveau, la STT serait synthétisée par les fibres afférentes et par plusieurs interneurons glutamatergiques (excitateurs) (Todd et al., 2003; Yasaka et al., 2010), qui la libèreraient lors de stimulations nocives (Kuraishi et al., 1985; Yasaka et al., 2010). Ainsi, en conditions physiologiques normales, la STT inhiberait la transmission GABAergique, agissant donc comme substance pro-nociceptive en entraînant une désinhibition des signaux nociceptifs (Sten Shi et al., 2014; Yasaka et al., 2010). Lors de conditions de douleur pathologique, alors qu'une plasticité synaptique ainsi que plusieurs autres processus de sensibilisation s'installent, l'expression de STT se voit régulée à la hausse, et prendrait à ce moment un rôle anti-nociceptif (Sten Shi et al., 2014; Yasaka et al., 2010). En effet, suite à une étude réalisée sur un modèle de douleur inflammatoire murin induit par une lésion au nerf sciatique, il a été suggéré qu'une forte relâche de la STT réduirait la désinhibition au niveau de la corne dorsale *via* l'internalisation des récepteurs sst2A. Ces récepteurs pourraient d'autant plus être retrouvés au niveau des fibres sensorielles afférentes lors d'inflammation, inhibant alors la relâche de neurotransmetteurs excitateurs, comme la SP, le CGRP et le glutamate (Sten Shi et al., 2014). Ainsi, ce neuropeptide serait un indicateur pertinent de la mise en place de processus de sensibilisation centrale (Gervais et al., 2019; Otis et al., 2017).

4. Épigenétique et la douleur chronique

Le terme épigénétique aurait commencé à être employé à partir des années 1940 afin de désigner des changements moléculaires attribués à des facteurs environnementaux ou développementaux qui surviennent en contrepartie à la séquence d'ADN (Geranton & Tochiki, 2015; Ligon, Moloney, & Greenwood-Van Meerveld, 2016). Aujourd'hui, le mot épigénétique est utilisé communément pour expliquer les différences phénotypiques interindividuelles qui sont indépendantes du code génétique (Geranton & Tochiki, 2015). Au niveau moléculaire cependant, les mécanismes épigénétiques ont une fonction importante de régulation de l'expression génique. Ces mécanismes incluent typiquement des processus visant à modifier la structure de la chromatine, par la modification des histones ou encore par la méthylation de l'ADN (Crow, Denk, & McMahon, 2013; Geranton & Tochiki, 2015). D'autres contrôles épigénétiques se font cependant *via* des activités impliquant des molécules d'ARNs non codantes, incluant entre autres les miARNs, ou encore *via* la présence d'éléments rétrotransposables (Geranton & Tochiki, 2015). L'épigénétique est un phénomène critique pour le développement et joue un rôle important dans la différenciation cellulaire lors de l'embryogenèse (Buchheit, Van de Ven, & Shaw, 2012). En effet, plusieurs mécanismes épigénétiques participant au développement resteraient actifs au niveau des neurones différenciés à un stade terminal. Il est d'autant plus accepté aujourd'hui que ces mécanismes sont impliqués dans la réponse à la pression environnementale, notamment l'effet du stress, l'apprentissage ou encore le phénomène de dépendance (Geranton & Tochiki, 2015). Enfin, la dérégulation des processus épigénétiques a été associée à un large spectre de maladies neurologiques et possiblement à l'établissement de phénomènes liés à la douleur chronique, tels que l'hypersensibilisation (Crow et al., 2013; Geranton & Tochiki, 2015).

4.1. Micro-ARNs

Comme mentionné, les ARN non codants permettent de contrôler l'expression génique *via* leur interférence avec l'ARN messager (Buchheit et al., 2012). Ces molécules incluent notamment les petits ARNs interférents, les miARNs, les longs ARNs non codants et les petits ARNs en épingle (Buchheit et al., 2012; Ligon et al., 2016). Récemment, des études ont permis de mettre en évidence la contribution des ARNs non codants dans les mécanismes de

développement et de maintenance de la douleur chronique (Lutz, Bekker, & Tao, 2014). Par ailleurs, ces molécules se sont montrées prometteuses au niveau thérapeutique et ont été utilisées dans le cadre d'essais cliniques sur des animaux pour des conditions de douleur chronique neuropathique et de maladies neurodégénératives, ainsi que dans le cadre d'essais cliniques chez l'humain pour le cancer (Bali & Kuner, 2014; Buchheit et al., 2012). L'implication potentielle des miARNs dans les processus de douleur arthrosique est ainsi au cœur de ce projet de maîtrise. La dérégulation de l'expression de miARNs individuels ou de familles entières de miARNs a déjà été associée à plusieurs pathologies chez l'humain et constitue ainsi un champ d'exploration pertinent dans l'optique de mieux comprendre la pathogenèse de l'arthrose tant chez l'Homme que chez l'animal de compagnie.

4.1.1. Description et biogenèse des micro-ARNs

Les miARNs sont de court ARNs, d'environ 22 nucléotides, simples brins et non codants. Ces petits ARNs non codants régulent au niveau post-transcriptionnel plusieurs processus biologiques et ont été identifiés chez les plantes ainsi que chez les animaux (D. P. Bartel, 2004). Les miARNs se lient avec une complémentarité complète ou partielle et de manière prédominante à l'extrémité 3'UTR de leur ARNm cible (Cai, Yu, Hu, & Yu, 2009). La liaison aux miARNs peut entraîner la répression de la transcription de l'ARNm ou sa dégradation, permettant ainsi un ajustement fin de la production de protéines (Liu, Li, & Cairns, 2014). L'action résultante de répression ou de dégradation dépend du degré de complémentarité miARN-ARNm (D. P. Bartel, 2004; Cai et al., 2009; McDonald & Ajit, 2015).

Les miARNs sont généralement générés à partir de séquences intergéniques, mais peuvent aussi provenir d'introns ou d'exons. Les étapes globales de la biogenèse de ces petits ARNs sont schématisées sur la Figure 5 (p.69), présentée ci-dessous (van Rooij & Kauppinen, 2014). D'abord les gènes des miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II dans le noyau en tant que séquences précurseurs (pri-miARNs) allant de 150- à 200- nucléotides. Les pri-miARNs se retrouvent sous forme de tige-boucle. La section de la « tige » constituée de séquences nucléotidiques partiellement complémentaires deviendra notamment le miARN mature (McDonald & Ajit, 2015; van Rooij & Kauppinen, 2014; Yu et al., 2011). À partir du pri-miARN, le complexe Drosha-DGCR8 qui porte une endonucléase, ou plus spécifiquement

une ribonucléase de type III (RNase-III), effectue un clivage du pri-miARN au niveau de base de la tige pour générer un second précurseur (pré-miARN) d'environ 70 nt. Le pré-miARN résultant est ensuite exporté au cytoplasme *via* la protéine de transport *exportin 5* (D. P. Bartel, 2004; Creugny, Fender, & Pfeffer, 2018; Kynast, Russe, Geisslinger, & Niederberger, 2013; Niederberger, Kynast, Lotsch, & Geisslinger, 2011; van Rooij & Kauppinen, 2014). Dans le cytoplasme, le complexe Dicer-TRBP, composé d'une autre RNase-III, effectue un second clivage du miARN précurseur dans la région près de la boucle de la molécule générant ainsi, le duplex-miARN mature qui est en fait une courte séquence d'environ 22 nucléotides double brin (D. P. Bartel, 2004; Creugny et al., 2018; Kynast, Russe, Geisslinger, et al., 2013; van Rooij & Kauppinen, 2014). Ce duplex contient alors un brin « guide » et un brin « passager ». Les deux brins seront alors séparés l'un de l'autre par une hélicase. Puis, à la suite d'un processus à ce jour non connu, le complexe de silençage induit par l'ARN (ou complexe RISC, pour *RNA-Induced Silencing Complex*) sélectionne le brin guide. Le complexe RISC associe alors le brin guide à la protéine Argonaute (AGO) du complexe liant l'ARN. Le miARN mature et incorporé au complexe RISC devient ainsi en mesure de lier par complémentarité les ARNs messagers pour ultimement les réprimer ou entraîner leur destruction (D. P. Bartel, 2004; Creugny et al., 2018; Kynast, Russe, Geisslinger, et al., 2013; McDonald & Ajit, 2015; Niederberger et al., 2011; van Rooij & Kauppinen, 2014).

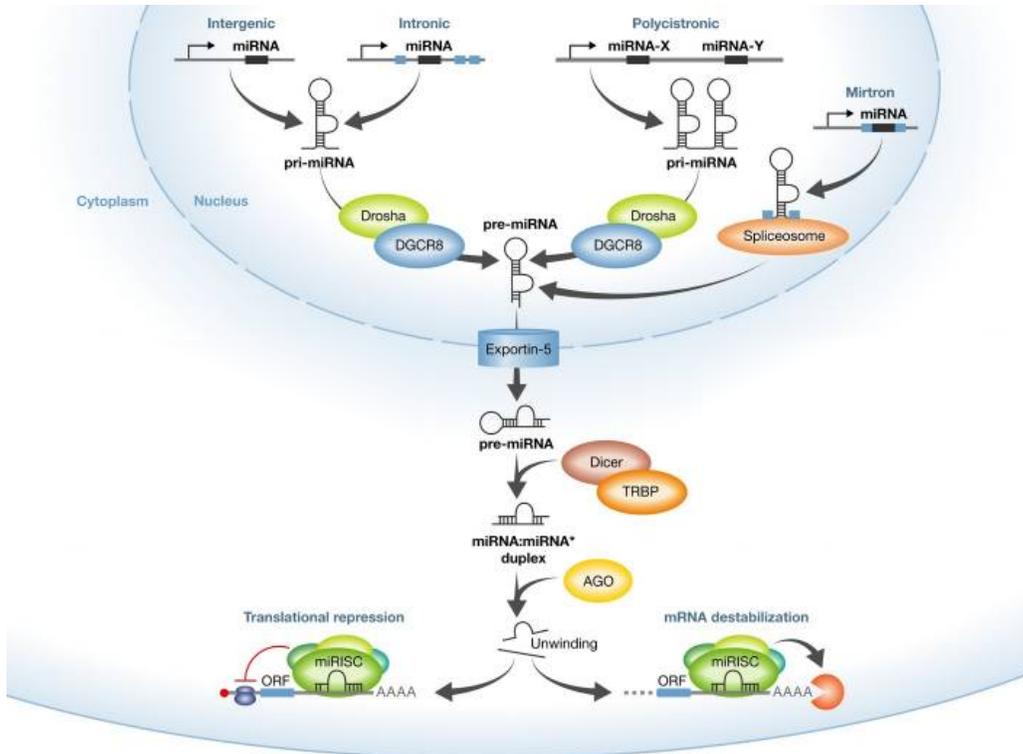


Figure 5. Biogenèse des miARNs.

Les miARNs peuvent être générés à partir de séquences provenant de diverses régions du génome. D’abord, l’ARN polymérase II produit un transcrit précurseur (pri-miARN) = sous forme de tige-boucle. Ensuite, dans le noyau le complexe Drosha-DGCR8 effectue un premier clivage pour générer un second précurseur (pré-miARN). Le pré-miARN est ensuite exporté *via* la protéine de transport *exportin 5* au cytoplasme, où le complexe Dicer-TRBP effectue un second clivage du miARN précurseur générant le duplex-miARN mature double brin. Les deux brins sont alors séparés l’un de l’autre et le brin guide est associé à la protéine AGO pour ensuite être incorporé dans le complexe RISC où il sera en mesure de réprimer ou détruire les ARNs messagers. Figure modifiée, tirée de (van Rooij & Kauppinen, 2014).

4.1.2. Implications physiologiques et pathophysiologiques des micro-ARNs

Il a été démontré que les miARNs sont des joueurs importants de la régulation de l’homéostasie développementale et cellulaire. En effet, ceux-ci interviennent au niveau d’une grande variété de processus biologiques, incluant entre autres le développement, la prolifération et la détermination cellulaires, ainsi que le contrôle de la croissance et l’apoptose (Liu et al., 2014; Sun & Shi, 2015). Au cours des dernières années, des études ont permis d’établir que la conséquence d’une expression de miARNs aberrante pouvait entraîner le développement de conditions pathologiques (Lutz et al., 2014). Plusieurs études ont notamment rapporté une

expression de miARNs altérée dans divers types de cancers, tels les cancers du sein, du poumon, de la prostate, du colon, des ovaires et de la tête et du cou (Liu et al., 2014). En effet, leur implication au niveau de la régulation des suppresseurs de tumeur ou des inhibiteurs de l'apoptose leur confère un rôle important dans la progression de tumeurs (Niederberger et al., 2011). Les miARNs auraient également une implication dans l'éthologie et la progression de maladies cardiovasculaires (Andersen, Duroux, & Gazerani, 2014; Niederberger et al., 2011). Certaines autres études ont également démontré l'implication des miARNs dans l'établissement de maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques et la schizophrénie (Andersen et al., 2014; Liu et al., 2014). Les miARNs seraient aussi impliqués dans des maladies inflammatoires, dont l'arthrose où ils seraient en partie liés à la destruction du cartilage (Kynast, Russe, Geisslinger, et al., 2013; Niederberger et al., 2011; Yu et al., 2011). De surcroît, une implication dans les processus de douleur a également été conférée à ces petits ARNs. Leur rôle clé dans la régulation de l'expression génique ainsi que dans le développement du système nerveux a permis de proposer leur implication dans les processus de perception et chronicité de la douleur (Kynast, Russe, Geisslinger, et al., 2013; McDonald & Ajit, 2015; Niederberger et al., 2011).

4.1.3. Douleur arthrosique et micro-ARNs

Chez les mammifères, les miARNs agissent sur plus de 60% des gènes (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). Considérant qu'une altération de l'expression protéique est observée dans pratiquement toutes les conditions de douleur, il semble bien probable que les miARNs soient impliqués dans cette régulation protéique anormale. En effet, le déséquilibre de l'expression protéique peut résulter tant d'une déficience au niveau génétique (Andersen et al., 2014), qu'aux niveaux épigénétique et/ou transcriptionnel. D'ailleurs, une recherche réalisée chez la souris visant à étudier le rôle des miARNs dans les voies nociceptives périphériques a su démontrer que la délétion de Dicer altérait la douleur inflammatoire, sans toutefois affecter la réponse nociceptive aiguë, suggérant alors que le rôle des miARNs dans les voies afférentes primaires est important dans l'inhibition du développement de comportements associés à la douleur chronique (Zhao et al., 2010). Par ailleurs, la régulation altérée de miARNs ciblant des régulateurs de douleur clés, tels que GABA_{α1} (Sengupta et al., 2013), COX-2 (*Cyclo-Oxygenase enzyme 2*) (Akhtar & Haqqi, 2012; Park, Cheon, & Kim, 2013), TRPV1 (*Transient Receptor*

Potential Vanilloid 1) (Li et al., 2011) et plusieurs canaux Na^+ et Ca^{2+} (Favereaux et al., 2011; Li et al., 2011; von Schack et al., 2011), a été démontrée dans divers modèles de douleur (Andersen et al., 2014). D'autant plus, certaines études ayant associé le changement de l'expression des miARNs spécifiques à des conditions de douleurs ont démontré que la régulation spatiale et temporelle intracellulaire des miARNs survient à des moments spécifiques correspondant selon chacun à différentes phases (précoce ou tardive) de la condition étudiée. Or, les mécanismes et interactions entre les miARNs neuronaux et les cibles nociceptives restent à être compris plus en détail (McDonald & Ajit, 2015). Plusieurs études ont été conduites sur des modèles animaux d'arthrose dans l'optique de comprendre l'association des changements dans l'expression des miARNs et la pathogenèse de cette maladie (Andersen et al., 2014).

Peu d'études analysant le rôle des miARNs dans la physiopathologie de l'arthrose ont été réalisées sur des modèles d'arthrose induite chirurgicalement. Néanmoins, miR-146 et miR-183, tous deux étudiés dans des modèles rongeurs d'arthrose induite chimiquement et chirurgicalement, ont été associés aux processus liés à la douleur arthrosique (Li et al., 2011; Li et al., 2013). Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de miR-146a était diminuée de manière marquée au niveau du système nerveux nociceptif, tant au niveau central que périphérique dans un modèle MIA d'arthrose chez le rongeur (Li et al., 2011), de même que dans un modèle chirurgical (Li et al., 2013). Étonnamment, au niveau local (cartilage, synovium et synoviocytes), l'expression de miR-146a semblerait, à l'inverse, augmentée chez les sujets arthrosiques (Li et al., 2011; Yamasaki et al., 2009). Le miR-146 a ainsi été associé tant à la régulation de protéases dégradant le cartilage, qu'à celles des molécules inflammatoires et neurotransmetteurs de douleur associés à la douleur dans les tissus articulaires (Li et al., 2011; Li et al., 2013; Yamasaki et al., 2009). D'autant plus, ce miARN serait également impliqué dans la modulation de cytokines inflammatoires (Recchiuti, Krishnamoorthy, Fredman, Chiang, & Serhan, 2011; Taganov, Boldin, Chang, & Baltimore, 2006) et des molécules associées à la douleur dans les astrocytes des systèmes nerveux central et périphérique (Li et al., 2011). Le miR-183, de manière similaire à miR-146, est un miARN qui a été associé à la douleur arthrosique suite à des études réalisées sur des modèles de douleurs inflammatoires (Li et al., 2013) et neuropathiques, soit par la ligature du nerf sciatique (SNL, pour *Sciatic Nerve Ligation*)

(Aldrich, Frakes, Kasuya, Hammond, & Kitamoto, 2009; Lin, Chen, Yang, Huang, & Sheen-Chen, 2014).

Par ailleurs, il a été suggéré suite à plusieurs études réalisées sur divers modèles de douleur inflammatoire, que l'effet des miARNs dans l'établissement de la douleur chronique résulte de leur action de blocage de la transcription ou de dégradation des ARNm, alors qu'ils ciblent spécifiquement des gènes liés à la douleur (Liu, Wang, Lu, & Xu, 2009; Lutz et al., 2014). Par exemple, des modifications épigénétiques altérant l'expression de miR-219 réguleraient l'inflammation chronique (Liu et al., 2009; Pan et al., 2014). Ce miARN exprimé préférentiellement dans le système nerveux central a été caractérisé comme ayant un lien dans plusieurs pathologies neurologiques, lui attribuant ainsi un rôle dans d'autres maladies impliquant une dysfonction au niveau central dans le système nerveux. Suivant cette hypothèse, un modèle de douleur inflammatoire chronique induit par l'adjuvant complet de Freud a permis de démontrer que miR-219 pouvait réguler la douleur inflammatoire chronique en ciblant la protéine kinase CaMKII γ (pour, *Ca²⁺/calmoduline-dépendant type II gamma*) (Pan et al., 2014). L'altération de l'expression de miR-124 a d'autant plus été associée à l'établissement de la sensibilisation nociceptive au niveau central et aussi au niveau périphérique, notamment dans la microglie de la moelle épinière (Willemen et al., 2012). Dans un modèle de douleur inflammatoire réalisé par l'injection de formaline chez la souris, où l'expression de miR-124 était diminuée au niveau de la moelle épinière, il a été suggéré que le CpG-binding protein 2 et des gènes pro-inflammatoires étaient ciblés par ce miARN (Kynast, Russe, Moser, Geisslinger, & Niederberger, 2013). Des études supplémentaires réalisées sur des modèles rongeurs de douleur neuropathique et inflammatoire ont d'autant plus permis de démontrer que des déséquilibres dans l'expression de miR-124 dans le système nerveux somatosensoriel seraient liés à la transition d'un état de douleur aiguë à une douleur persistante chronique (Bai, Ambalavanar, Wei, & Dessem, 2007; Nakanishi et al., 2010). Le miR-181, également d'intérêt dans la recherche de marqueurs de la douleur arthrosique, démontre un potentiel notable de par son implication non seulement au niveau de la dégradation du cartilage articulaire (Nakamura et al., 2019; Nakamura et al., 2016; Song et al., 2013), mais également, puisqu'il comporte plusieurs sites de liaison complémentaires pour la sous-unité du récepteur GABA_{A α -1} (Sengupta et al., 2013; Zhao et al., 2012). La réalisation d'une étude basée sur un modèle d'inflammation

de la vessie chez des rats nouveau-nés *via* l'injection de Zymosan, a effectivement permis de démontrer que l'état inflammatoire augmente l'expression de miR-181 au niveau spinal et ceci expliquerait la répression du système inhibiteur de la nociception GABA (Sengupta et al., 2013).

Considérant que l'arthrose comporte non seulement une composante de douleur inflammatoire, mais également une composante neuropathique, plusieurs miARNs associés à ce type de douleur, dont miR-218, constituent des cibles d'autant plus pertinentes dans l'étude de la douleur arthrosique (von Schack et al., 2011). Plusieurs autres miARNs seraient impliqués dans le développement de douleurs chroniques tant inflammatoires que neuropathiques. Parmi ceux-ci, miR-21 en est un dont l'expression altérée a été remarquée par plusieurs groupes, et ce, dans divers modèles (Bhalala et al., 2012; Fujita et al., 2008; Recchiuti et al., 2011; Sakai & Suzuki, 2013, 2014). Notamment, dans un modèle de douleur inflammatoire présentant de l'allodynie ayant été induit par l'administration intrathécale de l'agent inflammatoire IL-1 β chez le rat, l'expression de miR-21 était régulée à la hausse au niveau du ganglion de la racine dorsale (Sakai & Suzuki, 2013). Ainsi, il a été suggéré que ce miARN participerait aux conditions de douleur neuropathique en phase tardive, en régulant à la baisse plusieurs cibles dont des régulateurs inhibiteurs de MMP, un inhibiteur endogène de phosphatidylinositol 3-kinase et d'inhibiteurs de kinase extracellulaire régulée par signal (Sakai & Suzuki, 2013, 2014). Ce genre d'étude basée sur différents modèles de douleur inflammatoire, où des changements dans l'expression de miARNs sont observés, permet de démontrer que non seulement les miARNs modulent l'expression de gènes nociceptifs, mais que les agents inflammatoires affectent également l'activité des miARNs (Descalzi et al., 2015). De manière similaire, miR-195 est aussi régulé à la hausse lors de lésions nerveuses périphériques et il a été suggéré qu'il exacerberait les douleurs neuro-inflammatoires et neuropathique en inhibant l'activation de l'autophagie microgliale (Shi et al., 2013; Yu et al., 2011). Ainsi, l'activité des miARNs aurait un lien fonctionnel dans la régulation des réseaux de neurones spinaux et dans la sensibilisation nociceptive (Descalzi et al., 2015). Bien que certains miARNs semblent démontrer une dérégulation constante au travers des différents modèles inflammatoires et neuropathiques, réalisés dans divers tissus, certains démontrent des altérations plus variables selon l'étude en question (Descalzi et al., 2015). Par exemple, mir-1 a été associé aux douleurs inflammatoires et neuropathiques (Kusuda et al., 2011), ainsi qu'à celles liées au cancer (Bali et al., 2013).

Toutefois, l'importance de l'altération de sa régulation semble variable selon le type de douleur. En effet, lors d'une lésion nerveuse partielle, l'expression de miR-1 est augmentée au niveau du ganglion de la racine dorsale, alors qu'une axotomie du nerf sciatique régulerait paradoxalement à la hausse son expression (Kusuda et al., 2011). Cet exemple souligne bien l'importance de prendre en compte l'impact de l'ensemble des détails techniques et les restrictions du design expérimental sur les résultats si l'on veut être en mesure tirer des conclusions biologiques valables (Descalzi et al., 2015).

Les miARNs ont permis de démontrer la présence d'interactions entre les gènes régulant le métabolisme, les molécules inflammatoires et les enzymes contrôlant l'homéostasie du cartilage dans l'arthrose tant chez l'humain (Iliopoulos, Malizos, Oikonomou, & Tsezou, 2008) que dans les modèles animaux de dommages articulaires (Tao et al., 2017). En effet, une étude ayant analysé l'expression de miARNs directement au niveau du cartilage humain a permis d'associer la destruction du cartilage à divers mécanismes inflammatoires qui seraient notamment régulés par ces petits ARNs. Selon leurs diverses cibles au niveau des processus inflammatoires, certains des miARNs étaient régulés à la hausse, par exemple miR-483 qui ciblerait la protéine aggrecane, alors que d'autres étaient régulés à la baisse, tel que miR-26 qui ciblerait la protéine asporine (Iliopoulos et al., 2008). L'expression aberrante de miARNs s'observe dans plusieurs conditions de douleur chronique, ainsi ces petites molécules présentent un fort potentiel comme biomarqueurs de la douleur. Des conditions telles que l'arthrite rhumatoïde ou encore le syndrome de douleur régional complexe sont des exemples autres que l'arthrose où l'étude des miARNs pourrait permettre d'élucider des mécanismes de douleur chronique pertinents. Par exemple, dans une étude réalisée sur un modèle murin d'arthrite rhumatoïde induite par le collagène, une régulation à la baisse de mir-106 a été corrélée à l'atténuation de la réponse inflammatoire et de la destruction osseuse (Tao et al., 2017). De surcroît, une étude réalisée chez des humains atteints du syndrome de douleur régional complexe, a permis de démontrer une association entre des changements d'expression de plus d'une dizaine de miARNs, de marqueurs inflammatoires et de paramètres cliniques des patients (Orlova et al., 2011).

4.1.4. Analyse et détection de micro-ARNs

L'expression des miARNs peut être caractérisée et quantifiée au niveau cellulaire, tissulaire et des fluides corporels grâce à la disponibilité d'une grande variété de méthodes (McDonald & Ajit, 2015). Plusieurs études s'intéressant aux voies de traitement de la douleur se sont penchées sur la régulation et la fonction des miARNs dans différents modèles animaux. Celles-ci ont d'ailleurs permis de démontrer l'altération de l'expression des miARNs dans divers tissus impliqués dans la douleur causée par une stimulation inflammatoire périphérique ou encore en réponse à une douleur neuropathique (Kynast, Russe, Geisslinger, et al., 2013). Ces tissus incluent notamment des tissus nerveux périphériques (c.-à-d. des nerfs périphériques), les ganglions de la racine dorsale, la moelle épinière et le cerveau (Kynast, Russe, Geisslinger, et al., 2013). Ces études réalisées dans les modèles animaux sont utiles pour déterminer les changements de l'expression des miARNs spécifiques à un tissu donné lors de différentes conditions de douleur. De plus, diverses recherches sur les pathologies impliquant des dommages articulaires ont analysé l'expression des miARNs au niveau des cellules et des tissus composant l'articulation (Andersen et al., 2014; Dou et al., 2014; Yu et al., 2011). Cependant, au niveau clinique une certaine difficulté se présente au niveau du prélèvement d'échantillons des différents tissus d'intérêt, qu'ils soient nerveux ou articulaires. Ainsi, l'analyse de miARNs circulant chez des patients atteints de douleur chronique s'est montrée une alternative intéressante, ces petites molécules étant sensiblement présentes dans tous les biofluides (Andersen et al., 2014; McDonald & Ajit, 2015). Il est d'autant plus important de noter que les miARNs circulants englobent non seulement tous les miARNs retrouvés dans les biofluides, mais également ceux associés à des protéines liants l'ARN et au cholestérol, ainsi que ceux encapsulés dans les vésicules extracellulaires (exosomes, micro-vésicules et corps apoptotiques) (Malda, Boere, van de Lest, van Weeren, & Wauben, 2016; McDonald & Ajit, 2015).

Lors de l'analyse pangénomique de l'expression des miARNs, différentes méthodes peuvent être utilisées pour en détecter la présence et/ou l'abondance. Ces méthodes incluent notamment les biopuces (« *micro-array* ») et le séquençage d'ARN. Quant au *micro-array*, il permet de détecter la présence de plusieurs miARNs dans un même échantillon. Cependant, ce type d'analyse permet uniquement l'étude de miARNs connus, alors que la puce utilisée contient d'emblée les séquences complémentaires d'un grand nombre de miARNs (van Rooij, 2011). De

plus, le *micro-array* nécessite une validation subséquente des données afin de quantifier chaque miARN identifié (McDonald & Ajit, 2015). Plus récemment, des plateformes de Séquençage de Nouvelle Génération ont été développées pour le séquençage de petits ARNs. À partir d'un échantillon donné, des millions de courtes séquences d'ARNs peuvent être générées par séquençage en parallèle du matériel présent au départ. Ainsi, puisqu'elle n'est pas limitée par le contenu initial de la puce, cette méthode offre l'avantage de mesurer l'abondance absolue de chaque miARNs présent dans l'échantillon. Par la même occasion, ceci offre la possibilité d'identifier de nouveaux miARNs. Évidemment, tout comme pour le *micro-array*, une confirmation des résultats du profil d'expression global obtenu se doit d'être réalisé par une méthode de quantification précise spécifique aux miARNs. La méthode la plus communément utilisée pour la détection spécifique de miARNs est la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR, pour *quantitative Polymerase Chain Reaction*) en temps réel (van Rooij, 2011).

Suite à la détection des séquences des miARNs présents dans l'échantillon, il est possible d'identifier ceux-ci à l'aide de bases de données en lignes et d'outils bio-informatiques. De plus, divers outils bio-informatiques permettent de déterminer des cibles validées ou potentielles des miARNs d'intérêts, ce qui rend alors possible l'étude de la fonction de ces miARNs (McDonald & Ajit, 2015).

4.2. Autres mécanismes épigénétiques potentiels de la douleur chronique

Outre la régulation de l'expression du génome au niveau post-transcriptionnel par les ARNs non-codants, les mécanismes épigénétiques sont principalement connus pour leur rôle au niveau de la transcription des gènes *via* la régulation de la forme de la chromatine. En effet, la modification des histones et la méthylation de l'ADN sont les mécanismes épigénétiques principaux qui agissent sur la structure de la chromatine afin de moduler son niveau de relaxation ou de condensation. Les effets de ces mécanismes épigénétiques sur l'ADN sont ainsi essentiels pour la modulation de l'expression du génome, mais également pour ce qui concerne la plasticité synaptique à long-terme. Ces processus sont par ailleurs potentiellement impliqués dans la régulation de changements moléculaires associés à des états de douleur persistants (Geranton & Tochiki, 2015).

Chez les eucaryotes, l'unité structurelle de base d'organisation de la chromatine est le nucléosome. Ce dernier se compose de 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère de protéines d'histone. L'interaction de l'ADN et des histones est dynamique, et plusieurs facteurs agissent sur le nucléosome pour inhiber ou accentuer la nature de cette association. Ainsi, la modification des queues amino-terminales des histones par la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation des résidus sérine, lysine et arginine est un mécanisme épigénétique qui module l'affinité des protéines d'histones et de l'ADN (Geranton & Tochiki, 2015; Watson et al., 2012). L'ADN étant chargée négativement, la présence de groupes électronégatifs d'acétyle ou de phosphate permet une certaine relaxation de la chromatine, facilitant alors l'activation de la machinerie transcriptionnelle (Crosio, Heitz, Allis, Borrelli, & Sassone-Corsi, 2003; Geranton & Tochiki, 2015). Toutefois, la modification des histones n'est pas si simple à caractériser. D'abord, la méthylation des histones peut résulter en l'activation ou en la répression de l'expression génique. L'effet de l'ajout d'un groupement méthyle dépend en effet du gène associé au nucléosome ciblé ainsi que des modifications déjà présentes au niveau de ce gène. De plus, il est parfois possible d'identifier des gènes présentant des marquages d'histone d'activation et de répression dans la même région. Ces gènes sont alors en équilibre, en attente d'un signal supplémentaire. Cet état d'équilibre pourrait d'ailleurs être indicateur d'un potentiel de plasticité dans l'expression du génome (Geranton & Tochiki, 2015). En outre, la modification des histones et la méthylation de l'ADN peuvent survenir en concomitance, modulant une fois de plus de manière variable le niveau de transcription (Geranton & Tochiki, 2015; Watson et al., 2012).

La méthylation de l'ADN est une modification covalente qui cible les dinucléotides CpG des résidus de cytosine de la molécule d'ADN pour générer le 5-méthylcytosine (Bell et al., 2014; Geranton & Tochiki, 2015). Tout comme pour les modifications d'histone, la conséquence fonctionnelle de la méthylation de l'ADN est complexe et dépend de plusieurs facteurs. Or, la méthylation de l'ADN dans les régions régulatrices 5' réprime généralement l'activité des promoteurs en interférant avec la liaison du facteur de transcription ou encore, en recrutant des protéines méthylées liant l'ADN qui altèrent l'efficacité de la transcription en attirant des complexes de silençage (Geranton & Tochiki, 2015). Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est d'une importance majeure dans la médiation de la répression des

gènes au cours du développement embryonnaire (Geranton & Tochiki, 2015; Massart et al., 2016). Néanmoins, elle est maintenant reconnue comme un processus dynamique survenant dans le système nerveux chez l'adulte (Geranton & Tochiki, 2015). Ce mécanisme d'épigénétique serait essentiel pour la plasticité synaptique et la formation de la mémoire (Geranton & Tochiki, 2015). En effet, au cours de la vie d'un individu, la méthylation de l'ADN permet de réguler les effets à long terme d'événements divers affectant la fonction du génome, ainsi que leurs effets sur les phénotypes comportementaux et physiques (Massart et al., 2016). Ce mécanisme d'épigénétique qui apporte des modifications relativement persistantes au niveau du génome serait ainsi impliqué dans les changements présents au niveau des systèmes nerveux et immunitaire dans des conditions de douleur chronique (Bell et al., 2014; Geranton & Tochiki, 2015; Massart et al., 2016).

Section 2 : Description du projet de maitrise

1. Problématique

Les pathologies associées à de la douleur chronique incluent des processus complexes qui n'ont pas été totalement élucidés à ce jour. L'arthrose est l'une de ces maladies et les répercussions négatives engendrées par celle-ci sont importantes tant au niveau individuel que sociétal. La compréhension incomplète de la physiopathologie de l'arthrose ainsi que la forte limitation dans les traitements offerts sont des problématiques majeures non seulement en santé humaine, mais aussi vétérinaire. Dans les dernières années, il a été mis en évidence que les résultats d'études précliniques, réalisées sur des modèles animaux, correspondaient difficilement aux résultats obtenus lors d'études cliniques. Le manque de validité des méthodes d'évaluation de la douleur chronique (non représentatives de la douleur d'intérêt), la fidélité déficiente à reproduire la condition humaine ou animale (validité déficiente du modèle lui-même) ou encore l'emploi de conclusions parfois trop générales pour certains modèles animaux pourraient notamment expliquer le nombre élevé d'échecs translationnels (Lascelles et al., 2018; Mogil et al., 2010; van der Worp et al., 2010).

Malgré tout, plusieurs modèles animaux ont été développés au fil du temps et bien qu'aucun ne puisse reproduire exactement la pathologie réelle, ceux-ci restent des outils pertinents dans l'étude des mécanismes de maintien de la douleur arthrosique. Afin de pallier la problématique de translation, il survient une nécessité à développer des méthodes objectives (et reproductibles) d'évaluation de la douleur ainsi que des modèles animaux de la douleur arthrosique rigoureux. Dans cette optique, les miARNs sont des molécules qui ont récemment démontré un potentiel intéressant dans l'étude de la douleur chronique, particulièrement pour l'arthrose.

2. Objectifs spécifiques

Afin d'améliorer notre compréhension de la douleur arthrosique, une recherche continue est réalisée en vue de développer des modèles expérimentaux reproduisant la physiopathologie de la maladie le plus fidèlement possible. Récemment, un modèle animal chirurgical ayant

démontré la capacité à induire des changements représentatifs de la douleur arthrosique ainsi que l'établissement de modifications associées à l'arthrose plus progressive a été mis au point. Bien que ce nouveau modèle engendre des modifications moins « agressives » en comparaison au modèle MIA, plusieurs évaluations et analyses ont été réalisées dans l'optique de mieux caractériser le modèle.

Ainsi, le premier objectif de ce projet visait d'abord à reproduire le modèle chirurgical d'arthrose DMM-CCLT développé par Gervais et al. (2019) chez le rat, en plus de soumettre les sujets à un protocole d'exercice modéré en vue d'amplifier les lésions d'arthrose. De plus, afin de comparer et confirmer les données obtenues pour ce modèle expérimental des analyses fonctionnelles, neuropeptidomiques et structurelles ayant déjà été validées préalablement ont été réalisées. Du coup, les analyses fonctionnelles de douleur réalisées incluaient l'évaluation statique de la distribution pondérale du poids, la réponse aux stimulations mécaniques tactiles (von Frey) et la réponse à la sommation temporelle mécanique. Celles-ci devaient être indicatrices de l'effet de l'induction d'arthrose chirurgicale chez le rat au niveau comportemental et sensoriel (Gervais et al., 2019; Martin Guillot et al., 2014; Otis et al., 2016; Otis et al., 2017). Par ailleurs, il était attendu que l'analyse de l'expression de certains neuropeptides spinaux, dont la SP, le CGRP, la BK et la STT, corrélait avec les résultats d'analyse fonctionnelle et serait possiblement indicatrice de l'établissement de la sensibilisation centrale survenant suite à l'induction de l'arthrose (Gervais et al., 2019; Otis et al., 2016; Otis et al., 2017). Afin de confirmer l'induction de la pathologie en termes de changements structuraux, des analyses macroscopiques et histologiques ont été réalisées (Bouet et al., 2019).

Le second objectif visait ensuite à analyser l'expression de miARNs au niveau de la moelle épinière des rats afin de déterminer si des changements épigénétiques tels qu'observés chez des patients (humains) atteints d'arthrose ou encore dans des modèles expérimentaux pouvaient avoir été engendrés par le modèle chirurgical. En effet, l'expression altérée de miARNs dans des modèles animaux pourrait permettre de révéler certains aspects du processus d'établissement et de persistance de l'arthrose (McDonald & Ajit, 2015). En fait, la variation de l'expression de certains miARNs précis serait spécifique à certains modèles ou conditions de douleur et pourrait ainsi révéler certaines informations propres au modèle étudié (McDonald & Ajit, 2015).

3. Hypothèse de recherche

L'hypothèse de recherche émise voulait ainsi que des marqueurs neuro-épigénétiques de l'arthrose puissent potentiellement être identifiés dans un modèle chirurgical d'arthrose rongeur. De plus, ces changements seraient susceptibles de survenir parallèlement aux autres changements préalablement notés, notamment en ce qui concerne la neuropeptidomique et les données d'analyses fonctionnelles. Ceci mènerait conséquemment à une meilleure compréhension des diverses composantes impliquées dans les mécanismes de la douleur arthrosique. Plus spécifiquement, il serait attendu que les analyses fonctionnelles reflètent l'établissement et la persistance d'une sensibilisation centrale chez le groupe de rat arthrosique jusqu'à la fin de l'étude. Ainsi, chez les rats arthrosiques, un transfert de poids significatif vers le membre non arthrosique devrait être observé lors de l'évaluation statique de la distribution pondérale du poids; une hypersensibilité devrait être mise en évidence par le test de von Frey; et un seuil de stimulation (nombre de stimuli) réduit de réponse à la sommation temporelle mécanique serait attendu. De plus, supposant la mise en place du phénomène de sensibilisation centrale suite à l'induction de l'arthrose une régulation à la hausse des neuropeptides spinaux analysés devrait être observée, sachant que ceux-ci agissent principalement comme médiateurs pronociceptifs. Évidemment, au niveau des tissus du grasset, les changements structuraux devraient être mis en évidence alors que les analyses macroscopiques et histologiques devraient montrer des lésions prononcées chez les sujets arthrosiques. Enfin, la présence d'une dérégulation dans l'expression de miARNs ayant une potentielle implication dans le développement de la douleur arthrosique serait attendue.

Section 3 : Article

Functional targeted neuropeptide and neuro-epigenetics changes in a surgical rat model of osteoarthritis pain

Cristofanilli Katrine-Ann¹, Otis Colombe¹, Bouet Émilie¹, Dalia Aoudj¹, Tardif Marianne¹, Martel-Pelletier Johanne², Pelletier Jean-Pierre², Beaudry Francis^{1,2}, Lussier Bertrand^{1,2}, Boyer Alexandre¹, Troncy Eric^{1,2}

1. Research Group in Animal Pharmacology of Quebec (GREPAQ) – Department of veterinary biomedicine, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, Saint-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada
2. Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal (QC), H2X 0A9 Canada

Abstract

In a surgical osteoarthritis (OA) rat model, this study aimed to detect neuro-epigenetic markers susceptible to correlate with functional targeted neuropeptide alteration. Micro-RNAs could procure great insights of neuropathological mechanisms associated with OA pain processing. Functional biomechanical (static weight bearing (SWB)) and sensory sensitization (quantitative sensory testing (QST)) alterations were followed over the whole study in surgically-induced OA rats ($n = 12$) and in healthy rats ($n = 12$). Joint structural (right stifle) and neuropeptides (spinal cord mass spectrometry) analyses were conducted 56 days after OA induction. Moreover, differential expression of spinal cord micro-RNAs was detected and validated by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Induction of OA caused important structural damages (reaching 35.8% of cartilage surface) associated with nociceptive sensitization: SWB asymmetry from $-56.3(11.8)\%$ at D7 to $-26.0(7.1)\%$ at D35, $P < 0.0001$, and tactile sensory sensitivity was present from D7 to D56, $P < 0.05$; pronociceptive neuropeptides substance P and bradykinin enhanced expression was combined with an increased spinal expression of miR-181b ($P = 0.029$). The latter is associated to the endogenous pain control system. This preliminary neuro-epigenetic research confirms that endogenous inhibitory control alteration is central in OA pain establishment.

Introduction

Osteoarthritis (OA) states as the most common degenerative joint disease, while currently affecting more than 25% of the adult population. Its ranking in the global burden of disease has been increasing year by year ¹ with aging of populations throughout the world, and increasing rates of obesity particularly. Representing a major cause of disability on a worldwide scale, its socioeconomic impact is huge ². Joint replacement faces an exponential growth and represents a final alternative ascribed in large part to the inadequacy of nonsurgical treatments with respect to pain relief, long-term adherence, and delay of OA disease progression ³. Therapeutics development in OA is challenging because of the OA symptoms complex duality in joint structural damage and pain. The link between the mechano-pathology and the biological responses (associated to pain) to mechanically driven injury is not linear. Changes in the biochemical environment of joint structures eventually participate to nociceptive peripheral sensitization ⁴. Hence, increased and continuous nociceptive inputs arising from the peripheral nervous system possibly result in central sensitization, a prolonged hyperexcitability of pain circuits in the central nervous system (CNS) ^{4,5}. Thus, patients suffering from advanced OA perceive pain that can sometimes be attributed to nociceptive and inflammatory mechanisms, but also to excessive (neuropathic) excitability (and/or deficient inhibitory control) in pain pathways ⁶.

Translation from experimental pain animal models to efficient clinical treatment for chronic pain presents major issues. Many believe that the foundation of translation failures can be explained by certain shortcomings in clinical trials ⁷. The lack of validity in chronic pain assessment methods or in some animal models may participate in the incapacity to translate promising intervention from animal models to clinical applications ⁷. Chemical intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA) is the most common OA pain model in rats ⁵. Furthermore, in the chemical MIA OA model, central sensitization could be correlated with an up-regulation of spinal neuropeptides that would in fact imply the activation of peripheral nociceptors located on peptidergic afferent C-fibers ⁸. However, critics emerged about the ethiopathogenesis, the acute occurrence and the temporal transience of this OA pain model, which are far from being related to the OA disease ⁹⁻¹¹.

Different surgical models of OA have been tested in rats, and the one combining cranial cruciate ligament transection (CCLT) and destabilization of the medial meniscus (DMM) was demonstrated to allow a progressive development of OA over time and indicated persistent chronic pain changes ¹². This included behavioral biomechanical alterations, sensory hypersensitivity and spinal neuropeptide changes ¹².

Epigenetic mechanisms regulate gene expression without affecting the primary DNA sequence. Expression of endogen small non-coding single-stranded RNA, defined as micro-RNAs (miRNAs), is one of the epigenetic mechanisms that have recently been drawing attention in the chronic pain field. These short sequences of about 22 nucleotides have the ability to post-transcriptionally modulate the genome expression. By binding with complementary sequences to the 3' untranslated region (3'UTR) of messenger RNAs (mRNAs), miRNAs regulate a wide range of biological processes ¹³. Since alteration in protein expression is known to be an important characteristic in the development of long-term hyperexcitability in nociceptive neurons, which contribute to chronic pain establishment, miRNAs could therefore be of great interest to elucidate some nociceptive sensitization processes ¹⁴. To our knowledge, only one study showed an altered expression of spinal miR-146a and miR-183 cluster, linked to OA pain in stifle joint, in a surgically induced OA rat model ¹⁵.

Our hypothesis of research suggested that some neuro-epigenetic markers of OA pain could be identified in a rodent surgical OA pain model in conformity with changes observed in functional targeted neuropeptide outcomes, which could consequently provide better understanding of constituents in OA pain mechanisms. Our goal was to compare CCLT-DMM surgically-induced OA rats and healthy Naïve rats for previously validated functional and neuropeptide pain assessment outcomes ¹², and specifically 1) to detect and validate miRNA potentially linked to OA by conducting real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assays on miRNAs isolated from a comparative spinal cord analysis; 2) to potentially link these neuro-epigenetic changes to the modulation in four different spinal neuropeptides, substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (STT), and functional changes that were previously related to OA pain in chemical ^{10,16} and surgical rat models ¹².

Results

Functional pain outcomes

Static weight bearing (SWB)

Statistical analysis of right hind limb (RHL) SWB values presented a significant group ($P < 0.001$), time ($P < 0.001$), and time \times group interaction effect ($P < 0.001$). Rats in the OA group exerted a markedly reduced force on their affected limb from the first assessment day (D) following OA induction (D7) to D35 inclusively (Figure 1-A, p.104) in comparison to the Naïve group. With time, OA rats gradually applied more weight on their RHL to reach, at D49, SWB values back to baseline (D-1) and with non-significant difference compared to the Naïve group ($P = 0.113$). The left hind limb (LHL) SWB values also demonstrated a group ($P < 0.001$), time ($P = 0.002$) and time \times group interaction effect ($P = 0.013$). Furthermore, the contralateral weight shift from RHL to the LHL was objectified with SWB asymmetry index (Figure 1-B, p.105). From D7 to D35 inclusively, the RHL-to-LHL SWB report in the OA group was statistically significant compared to the Naïve group (adj- $P < 0.001$). The SWB asymmetry index in the OA group ranged from -56.32(11.78)% at D7 to -26.03(7.11)% at D35 which represents a statistically significant difference in time ($P < 0.001$). These results indicate that rats were gradually reducing the weight shift from RHL to LHL, leading to normal symmetry index at D49.

Static quantitative sensory testing (static QST)

Statistical analysis of right hind paw (RHP) withdrawal threshold (PWT) values revealed a group effect ($P < 0.001$), despite no time effect ($P = 0.068$) and no time \times group interaction effect ($P = 0.271$). Hence, the OA rats presented decreased PWT (*i.e.*, tactile allodynia) in the ipsilateral (right) paw (Figure 2-A, p.106), during practically the whole study period ($P < 0.05$), as D35 was the only time point where the inter-group difference was not significant ($P = 0.225$). For left hind paw (LHP) PWT, no group ($P = 0.062$), time ($P = 0.713$), or time \times group interaction ($P = 0.347$) effects were observed. A contralateral tactile sensory sensitivity shift from RHP-to-LHP was observed, with a static QST asymmetry index presenting a group ($P < 0.001$) and a time \times group interaction effect ($P < 0.05$), despite no time effect ($P = 0.071$). Inter-group difference was in fact statistically

significant at D7, D14 and D49 ($P < 0.015$), as the static QST asymmetry index for the OA group merged toward the Naïve group at D56 (adj- $P = 0.295$) (Figure 2-B, p.107).

Dynamic quantitative sensory testing (dynamic QST)

Statistical analysis of response to mechanical temporal summation (RMTS) did not demonstrate any group ($P = 0.742$), time ($P = 0.462$) or time \times group interaction effect ($P = 0.659$). However, despite any statistically significant result, the OA group demonstrated a trend toward a decreased number of RMTS stimuli at D21 and D35 (Figure 3, p.108).

Molecular analysis

Comparison of spinal neuropeptides demonstrated an up-regulation of pain-related neuropeptides in the OA group in comparison to the Naïve group.

At D56, the OA group, compared to the Naïve group, presented a significant increase in the level of expression of SP ($P = 0.002$) and BK ($P = 0.002$) (Figure 4, p.109). The two other neuropeptides, CGRP and SST, showed a similar trend to be increased in OA rats, albeit the difference was not statistically significant ($P = 0.093$ and $P = 0.065$, respectively).

Comparison between the OA and Naïve groups for the expression level of fourteen miRNA showed some difference (Table 1).

Analysis of the data revealed that 56 days after surgical OA induction and regular exercise, miRNA expression in the OA rat spinal cord was different for one of the fourteen analyzed miRNAs (Table 1, p. 110). Indeed, miR-181b-5p, showed a statistically significant alteration in its expression ($P = 0.029$) in comparison to the Naïve group.

Evaluation of knee tissues

Induced-OA model in rats by CCLT – DMM surgery in combination with a slight exercise protocol entails macroscopic and histological lesions of knee structures.

The CCLT – DMM surgery induced significant ($P < 0.001$) cartilage damages in the stifle ($(35.27 \pm 9.00)\%$ cartilage lesion score), compared to the Naïve group (Table 2,

p.111). Histological alteration of cartilage in OA rats stifle joints appears to be mainly due to increased chondral lesions, proteoglycan loss and increased cluster formation.

Discussion

The reproducibility crisis in scientific research contributed to the translational crisis, as the credibility of efficacy data obtained from animal disease models has been called into question, in the pain field specifically¹⁷. Given that an animal model consists of a subject, a method of disease (pain) induction (*i.e.*, an assay) and some outcomes measurement, each of these components should reflect, as closely as possible, the clinical condition to which the results are to be applied¹⁷. Different animal models have been employed for the investigation of OA pain mechanisms and testing of potential treatment. The ideal animal model should be reliable, valid and offer the best translational value possible¹⁸. With a main interest for OA rat models, we tested the psychometric validity (repeatability and inter-rater reliability) of different functional biomechanical (SWB, dynamic weight bearing, mobility/coordination), operant (place escape/avoidance paradigm) and sensory sensitization (QSTs) outcomes¹⁰. A conscientious acclimatization protocol was established, and the influence of environment (gender and experience of the observer, inverted circadian cycle, exercise) was analyzed on the same outcomes¹⁰. Using intra-articular MIA, the most popular OA pain model¹⁸, we tested the sensitivity of the most reliable functional outcomes and neuropeptides to detect OA pain. The responsiveness of these assessments to different treatments such as punctual intra-articular lidocaine^{10,16}, or repeated subcutaneous pregabalin, morphine or carprofen curative medication was also characterized¹⁹. Considering the limitations of the chemical MIA OA pain model, *i.e.* artificial rapidity and transience in lesion occurrence, limiting opportunity in assessment often at one time-point¹¹, substantial difference in gene arrays and etiopathogenesis from human OA⁹, we tested several surgical OA pain models in rats¹². After this pilot study establishing the CCLT – DMM surgical model as the most convincing, a conditioned program of exercise post-OA induction was added with the goal to homogenize the induced structural alterations²⁰. Consequently, our present goal was to validate a panel of pain assessment methods, including functional neuropeptidomics and neuro-epigenomics on this experimental (surgical with exercise) OA model, in order to characterize OA pain with great reliability, validity and reproducibility.

The functional pain outcomes evaluations suggest that the CCLT – DMM surgery with regular exercise led to biomechanical (SWB) and sensory sensitization (QST) alterations related to OA development. The weight shift from the ipsilateral RHL to contralateral LHL on SWB was significant for the OA rats from the first assessment timepoint (D7) post-OA induction, up to D49. This suggests that the rats perceived an important discomfort in the RHL that had joint surgery, as they were attempting to relieve the noxious sensation by reducing the weight applied on it ¹². Standing on hind limbs should not be painful or uncomfortable for rats hence, the fact that the CCLT – DMM group perceived spontaneous pain in SWB assessment can be seen as biomechanical allodynia, suggesting too sensory sensitization.

The significant decrease in the RHP PWT persisting throughout almost the entirety of the study and the significantly higher contralateral transfer at certain timepoints, demonstrated by lower static QST asymmetry index values, are indicative of the presence of a centralized sensitization. Indeed, the von Frey stimulation in the plantar region of the hind limbs is secondary to the damaged knee joint region; therefore the results could represent referred pain, similar to what is observed in OA patients ²¹. Furthermore, the dynamic QST results showed a trend to lower scores for OA rats at D21 and D35. Decreased RMTS is a form of expression of central nociceptive hypersensitivity ^{22,23}. Temporal summation has been largely used to investigate spinal cord excitability, representing the early phase of neuronal windup. Spinal windup is considered as an intrinsic part of the first changes in the CNS consecutive to pathological pain. It is described as an activity-dependent facilitation, where low frequency repetition of a stimulus at a fixed-intensity level increases in dorsal horn neurons the action potential discharge that will then be followed by after discharges ^{22,23}. These changes eventually lead to chronicity and so, temporal summation is a pertinent dynamic QST assessment in chronic pain studies ^{22,24}. Furthermore, temporal summation allows the evaluation of the centralized sensitization phenomenon with conscious perception contrarily to PWT (static QST) which is a sensory-reflexive evaluation of hypersensitivity ²². Central sensitization mechanisms include various biochemical processes such as increased spinal release of neurotransmitters and neuromodulators, and increased excitability of postsynaptic neurons ²⁵. Neurophysiologically, temporal summation occurs when one presynaptic neurone releases

neurotransmitter(s) many times over a period of time. The total amount of neurotransmitter(s) released may exceed the threshold value of the postsynaptic neurone, inducing excitability^{23,25}. To the authors knowledge, this is the first report of a RMTS method applied to an experimental OA rat model suggestive of a spinal windup phenomenon most likely to arise about three weeks after the CCLT – DMM surgery. Thus, all three functional pain outcomes assessments indicated that OA rats underwent nociceptive centralized sensitization processes that were mostly objectified from D7 to D35. Only was it remaining at D49 and D56 for the RHP PWT. This decline in centralized sensory sensitization was previously reported to be linked with regular exercise post-OA induction in rats, as it was not observed in sedentary rats arising from the same surgical (CCLT – DMM) model²⁰.

Neuropeptide analysis performed in the spinal cord 56 days following the CCLT – DMM surgery in rats submitted to regular exercise, also supports the information provided by the functional pain outcomes. The amino acids, glutamate and aspartate constitute the main excitatory neurotransmitters in the nociceptive somatosensory system for the transmission between primary afferent fibers and spinal neurons. Persistent activation of post-synaptic receptors leads to sensitization of dorsal horn neurons that includes an increase in receptive field size (spatial summation), decreased activation threshold and prolonged depolarization (temporal summation)^{22,26}. The amino acids, glycine and γ -aminobutyric acid (GABA) are the chief inhibitory neurotransmitters in the somatosensory system^{26,27}. The inhibitory effects of norepinephrine in descending brainstem to the dorsal horn appear to be twofold, by directly activating inhibitory GABAergic interneurons, and by inhibiting excitatory interneurons. Serotonin is involved in descending inhibitory controls, predominantly in those originating from the midbrain *raphe magnus nuclei*. Classically, neuropeptides are considered as modulators of the sensory transmission, and classified as excitatory and inhibitory compounds. Substance P, neurokinin A, CGRP are present in intrinsic neurons of the spinal dorsal horn, and are only released following application of noxious stimuli that are sufficient to produce sustained discharges of unmyelinated C-fibers in the superficial layers²⁶. Instead of signaling as synaptic transmitters, these peptides tend to spread throughout the dorsal horn, potentially acting on multiple synapses some distance from their point of release (and consequently acting in

sensory sensitization). Recognized as spinal inhibitory neuropeptides are SST, the enkephalins, and possibly dynorphin. These peptides are contained in both intrinsic neurons of the dorsal horn (local circuit) and in the fibers descending to the dorsal horn from various brainstem *nuclei*. Sensory sensitization could come from the development of long-term potentiation, reduction of GABAergic and/ or glycinergic inhibitory neurotransmission (disinhibition), intrinsic plasticity of dorsal horn neurons and alterations in the properties of low-threshold mechanoreceptive A β afferents. Many excitatory interneurons contain SST, and the resulting increase in the release of this peptide may hyperpolarize nearby inhibitory interneurons, thus having a disinhibitory action²⁸. Herein, both SP and CGRP pro-nociceptive neuropeptides demonstrated an increased expression in the OA group in comparison to the Naïve group, although only SP showed significant difference between groups. In the CNS, the up-regulation of CGRP is generally observed with a prolonged behavioral pain response in MIA rat models, and it is also known to enhance central SP release from primary afferent fibres^{27,29}. In fact, CGRP is known to have a marked role in the development of spinal nociceptive process as it has versatile interactions with other neurotransmitters/-modulators. On the other hand, SP is implicated later in this nociceptive process and with a more important and specific role in the maintenance of OA-related pain²⁷. Indeed, in the CNS, high concentration of SP enhances pain signals and response and is also implicated in the process of hyperalgesia²⁶. At D56, concentration of CGRP was lower than expected, suggesting that nociceptive sensitization could have been established and was being more and less maintained, in part by SP. In a dose-response comparative study of the chemical MIA model of OA in rats¹⁶, we observed a relationship in neuropeptide spinal content with severity of cartilage lesions and functional assessment. This was true for SP and CGRP, BK, SST, and transthyretin (TTR). These were also the most sensitive markers detected in our original neuropeptidomics wide screening in different pain animal models^{30,31}. Indeed, SST was the only neuropeptide to distinguish a dose-effect of MIA intra-articular injection¹⁶, as well to parallel the degree of structural alterations induced by different surgical OA models¹², suggesting a higher sensitivity in pain detection. Substance P, SST and TTR mimicked the beneficial effects observed on functional assessments for different analgesics, namely intra-articular

lidocaine ¹⁰, systemic pregabalin, morphine and carprofen ¹⁹, suggesting a higher sensitivity in responsiveness to treatment.

Somatostatin is known to exert anti-inflammatory and anti-(or pro-) nociceptive actions by interacting with other neuropeptides including SP and CGRP ³². Therefore, the increased release of SST in inflammatory conditions among with the other neuropeptides is indicator of potential for allodynia induction ¹². Herein, the data obtained showed that SST was increased in the CCLT – DMM group, yet the difference with the Naïve group was not significant ($P = 0.065$). Another interesting neuropeptide in OA pain is BK, a peptide of the kinin family. This neuromodulator is released at the site of tissue injury and inflammation, and acts on expressed B₂ G-protein-coupled receptors (GPCRs) and injury-induced B₁ GPCRs which are expressed on peripheral terminals of primary neurons ^{33,34}. It has also been suggested that kinins interact with other pro-inflammatory and hyperalgesic mediators such as CGRP and other neuropeptides, illustrating their pro-inflammatory and nociceptive properties ³⁴. Thus, BK holds a major role in peripheral pain sensitization and has been mainly considered as a peripheral inflammatory mediator. However, it has been noted that BK acts in central pain transmission, as B₁ and B₂ receptors have been identified in the DRG and SDH, to modulate glutamatergic transmission ³³⁻³⁵. Altogether, these results therefore indicate that at the end of the study, nociceptive processes were getting under a certain level of control, thus explaining the poor difference in functional pain outcomes observations at D49 and D56 (only present on RHP PWT). Furthermore, epigenomic changes ought to have a regulatory role in nociceptive processes, as the miRNA expression levels obtained also corroborate with the neuropeptidomic data analysis.

The value of circulating miRNAs for diagnostic, prognostic and therapeutic stratification purposes is a matter of growing interest in clinical medicine ³⁶. Our objective was to track potential differences in spinal miRNAs by comparing their expression in a Naïve group to a surgically induced OA group, before extending our works to other body fluids, such as serum. Our expectations were supported by the hypothesis of a good validity for this OA model ¹². They were partially fulfilled with the discovery of limited differences between the two groups 56 days (and even at D49) after OA induction. Clearly, the functional alterations were present up to D35, nevertheless at D56 the changes observed

on neuropeptidomics were declining. In the few past years, some research assessing miRNA expression in chronic, neuropathic and inflammatory pain conditions has been performed. Most studies were using chemical models such as intra-articular MIA injection³⁷, or inflammatory (complete Freund's adjuvant^{38,39}, formalin⁴⁰, interleukin-1 β ⁴¹) model, bone-cancer pain⁴², or neuropathic models⁴³⁻⁵¹, to demonstrate neural alterations in miRNA expression. In a recent neuropathic pain study³⁶, miR-30c-5p showed an up-regulation in the SDH two weeks after sciatic nerve injury. Interestingly, this miRNA was the only one that was significantly dysregulated following qPCR validation, and the next-generation sequencing fold change obtained was modest. Specifically to OA pain in rats, one study tested in a surgical (medial meniscus transection) model, behavioral (secondary tactile allodynia *via* static QST), structural and neuro-epigenomics alterations over a period of 8 weeks¹⁵. This work led to the isolation of miR-146a and miR-183 cluster down regulation in the DRG and spinal cord at weeks 4 and 8 (but not 2) after OA induction, whereas sensory sensitivity was sustained for the whole follow-up¹⁵. Furthermore, OA establishment in human patients or mice models has also been correlated to the dysregulation of miRNAs isolated from tissues other than the DRG or spinal cord, such as joint tissues (cartilage, bone, synovium)⁵²⁻⁵⁷. Using a DMM model in mice, it was not possible to demonstrate serum miRNA dysregulation between the OA group and the control group (Sham), even though DMM mice demonstrated significant histological signs of cartilage degradation⁵⁸.

In the present study, only one potential neuro-epigenomic biomarker demonstrated a different expression between the OA and Naïve groups. Nevertheless, the increased expression of miR-181b in the spinal cord of OA rats is interesting at multiple levels in the OA field of research. At a structural level, miR-181b and closely related family member miR-181a have been identified as potential mediators of cartilage degeneration in OA facet and knee joints⁵²⁻⁵⁴. Indeed, members of miR-181 family have been associated with an up-regulation of catabolic matrix metalloproteinase-13^{53,54}, release of inflammatory mediators and degradation of cartilage⁵³. Mir-181 family is, furthermore, of interest in OA at a functional level since it has been associated with GABAergic regulation^{59,60}. Sengupta and *al.* have indeed demonstrated that miR-181a and miR-181b were overexpressed in the spinal cord of a visceral inflammatory model: In a chronic zymosan-induced cystitis in rats,

the overexpression of miR-181b was associated with a down-regulation of GABA_A α -1 receptor subunit mRNA and protein ⁵⁹. The majority of neurons (>95%) in the SDH are local circuit interneurons involved in the release of neuromodulatory substances such as enkephalin, glycine and GABA ^{26,28}. It could be hypothesized that miR181b participates in the SDH inhibitory/facilitatory balance in nociceptive neuromodulation as suggested by our neuropeptidomics results, specifically with regards to SST and TTR, both involved in neuronal activity inhibition. Recently, TTR knockdown was associated with a decrease in GABA_A receptor expression ⁶¹, where we did observe a higher level of pain and allodynia in different pain models associated with decreased, and increased, spinal TTR, and SST, respectively ^{10,12,16,19,30,31}. Hence, these small molecules are promising pain assessment biomarkers as they can reflect dysfunction in pain processing at different levels (transmission, modulation, perception, *etc.*), therefore enhancing our comprehension of various chronic pain states and facilitating the development of novel analgesics.

Macroscopic and histologic assessments demonstrated severe lesions in the right stifle of rats in the OA group. From a histological point of view, chondral lesions, proteoglycan loss and cluster formation were the most significant lesions observed in the damaged stifle. Hence, CCLT – DMM surgery with exercise achieved to change the hyaline cartilage to the point where almost 20% of the structure showed irregularities and erosion. Moreover, enhanced cluster formation leads to a dysregulation of cartilage homeostasis that also affects other structures of the articulation ⁶². These alterations combined to the significant loss of proteoglycans, which are important hydrophilic substances that allows absorption of mechanical impacts, and of chondrocytes, usually trigger important changes in all the articular components which activate OA pain processes ⁶³. Nevertheless, as it has been evoked previously, the differences in miRNA expression found in OA subjects are not indicative of the extent of cartilage degeneration, but perhaps some other aspect of joint pathology ⁵⁸. Thus, the structure/function (including pain) correlation in OA would require further investigations, particularly for epigenomics considering that miR-181a appears to be involved in OA cartilage degradation ⁵²⁻⁵⁴.

Conclusion

This preliminary neuro-epigenomic study has demonstrated that pain establishment is greatly associated to the alteration of endogenous inhibitory control in surgically induced OA rats. Although a regular exercise protocol possibly led to eventual attenuation of nociceptive processes as from D35 in this model, consequent structural lesions were present. Moreover, assessment of functional pain outcomes throughout the study and neuropeptidomic analysis at D56 reflected that centralized sensitization to pain had developed and that the CNS was progressively getting nociceptive inputs under control even though inflammation signals were enhanced. Furthermore, neuro-epigenomic analysis showed an increased expression of miR-181b following inflammation and nociceptive inputs arising from stifle joint lesions. It could be proposed that overexpression of spinal miR-181b may repress the GABAergic central inhibiting system, leading to nociceptive transmission facilitation. This study obviously contains certain limitations including possible interference of the exercise protocol. In addition, sample size should be considered as an important limitation in this preliminary study, as type-2 error could have occurred. Moreover, molecular analysis performed at different timepoints throughout the study could have given interesting information, as functional outcomes suggested that central sensitization processes seemed mostly important in induced-OA rats between 21 and 35 days after the OA surgical induction. The present study highlights the potential use of neuro-epigenomic analysis in combination with observation of changes functional targeted neuropeptide outcomes to provide a more complete understanding of constituents in OA pain mechanisms and improvement in translational research.

Materials and methods

Ethics statement

Institutional Animal Care and Use Committee of Université de Montréal approved the protocol (#Rech-1766) which was 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.

Animals

This study was conducted on adult ovariectomized female ($n = 24$) Sprague-Dawley rats (Charles-River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) weighing between 230-250g at the beginning of the study. Rats were housed under regular laboratory conditions and maintained under a 12-hour light-dark cycle with food and water provided *ad libitum*. Animals were randomly divided in two groups; Naïve ($n = 12$) and surgically induced OA ($n = 12$). Subjects belonging to the same group were paired and caged together. Body weight was obtained weekly. Subjects size sample and experimental/housing conditions were based on previously conducted studies^{10,12}.

Induction of OA

Anesthesia and analgesia

On the day of the surgical intervention (D0), rats were placed in an induction box and anesthetized with an isoflurane-O₂ (IsoFlo®, Abbott Animal Health, Montreal, Québec, Canada) mixture. Anesthesia was maintained with 2% isoflurane-O₂ mixture *via* a face mask and a non-rebreathing Bain system. Following anesthesia induction, a single intramuscular injection premedication of 1.0 mg/kg of Buprenorphine SRTM (Chiron Compounding Pharmacy Inc., Guelph, ON, Canada) aimed to provide an approximate 72 hours analgesic cover¹². A periarticular block of 0.25% bupivacaine (Marcaine®, McKesson Canada, St.-Laurent, Québec, Canada) at a dose of 0.05-0.1 mL per stifle (< 1 mg/kg) was administered at the end of the surgical procedure¹².

Surgical OA-induction

Animals were prepared for an aseptic surgical technique concerning the rat right hind limb (ipsilateral). Surgical DMM-CCLT combo procedure was performed as previously described and validated ¹²: skin incision, medial parapatellar arthrotomy, lateral patella luxation, DMM (transection of the medial cranial meniscotibial ligament) and CCLT, luxation reduction and surgical site closure.

Exercise protocol

A regular exercise protocol was associated to the surgical OA-induction with the goal to reduce functional pain outcomes variability, as shown in the monosodium iodoacetate rat model ¹⁰, and to exacerbate and improve homogeneity in structural OA lesions ²⁰.

Functional pain outcomes

Biomechanical SWB distribution and somatosensory profile, using a QST protocol recognized as a behavioral expression of nociceptive sensitization ⁶⁴, were measured to evaluate functional pain. Rats were acclimatized to the evaluation environment at D-14, D-7, D-5 and D-3, according to a recent validation in rats ¹⁰. One day before OA induction, functional assessment baseline values were established. Assessments were repeated at D7, D21, D35, D49 and D56. Observers were female and operated during daylight, and were completely blinded to OA induction status and experimental design ¹⁰.

Static weight bearing (SWB)

An Incapacitance Meter[®] (IITC Life Science Inc., Woodland, Hills, CA, USA) was used to assess SWB distribution through the RHL and LHL. The weight applied (force) by the animal for each hind limb was measured and analyzed in grams but expressed in percentage of total body weight (%BW) to normalize the data for each individual. Measures were obtained over a 3 second period simultaneously for each limb and triplicate readings were taken at each time point.

Quantitative sensory testing (QST)

Static QST assesses the sensory threshold to or the rating of a single stimulus ⁶⁸. In this study, it included secondary tactile allodynia using an electronic von Frey Esthesiometer[®] with a propylene probe Rigid Tip[®] of 0.7 mm² surface, 28G (IITC Life Sciences Inc, Woodland Hills, CA, USA) to determine the PWT of each hind paw. Von Frey test was performed as described previously ^{10,12,16,19,20}. The peak of force was recorded in grams and a cut-off value was set at 100 grams. Both hind paws were evaluated alternately and triplicate measures of each were taken with 60 s intervals between stimuli, for each animal.

Dynamic QST assesses the response to a number of stimuli ^{22,65,66}, offering the opportunity to probe the central processing of incoming nociceptive signals ^{22,65}. RMTS was assessed by inducing repeated sub-threshold intensity mechanical stimuli (TopCat Metrology Ltd; Cambs, UK) previously validated in OA cats ²². Mechanical stimulation induced by the device was set at a predetermined and steady 2N intensity through a hemispherical ended metallic pin (2.5 mm diameter, 10 mm length) mounted on a rolling diaphragm actuator, adapted from a validated mechanical threshold testing system ⁶⁷. The mechanical stimulator was placed on the back of the rat and held by a narrow strap passing under the thorax just behind the front limbs. Animals were free to move in a cage before each session and during testing. Normal behavior of the rat wearing the device in the cage was observed for 5 minutes. Sessions were stopped by the evaluator as soon as clear disagreeable reaction was observed (*e.g.* vocalization, agitation, biting at the band) or when the cut-off number of stimuli ($n = 30$) was reached. For each assessment, a description of the rat behavior accompanied the number of RMTS stimuli.

Molecular analysis

Euthanasia and spinal cord collection

After the last functional evaluation day (D56), euthanasia was performed by transection of the cervical spine using a guillotine, following 4-5% isoflurane overdose.

Immediately after decapitation, collection of the whole spinal cord was achieved by a saline flush technique^{10,12,16,19,27}. Samples were rapidly snap-frozen in cold hexane, stored individually and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in view of neuro-epigenomic (half samples) and neuropeptidomic (half samples) analysis.

Neuropeptidomic analysis

Sample preparation. All chemicals were ordered in Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), except when specifically indicated. Tissue processing is an important step in preserving neuropeptides from *in situ* degradation⁶⁸. Rat spinal cords ($n = 6$ in each group) were individually weighted precisely, homogenized and prepared as previously published^{19,20}. Peptides were then extracted using a standard C18 solid phase extraction protocol as also published formerly^{19,20}.

Neuropeptidomic quantification. Quantification of extracted neuropeptides from spinal cord homogenate was achieved by mass spectrometry coupled with a liquid chromatography system. Chromatography was performed using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C18 $100 \times 1\text{ mm}$, with a particle size of $5\text{ }\mu\text{m}$ (Vanquish FLEX U-HPLC[®] system, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) as described previously^{19,20}. Mass spectrometry detection was performed, using a Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer[®] (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) interfaced with an UltiMate 3000[®] Rapid Separation U-HPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. Peptide quantification for SP, CGRP, BK and SST was expressed in fmol/mg of spinal cord homogenate, as previously described^{10,12,16,19,27}.

miRNA analysis

RNA extraction from spinal cord. Total RNA was extracted from a 30 mg lumbar portion of rat spinal cord samples (L5-S1) using miRCURY[™] RNA isolation kit for tissues (#300115, Exiqon Inc., Woburn, MA, USA). Manufacturer protocol was followed except for the elution step that was collected in $35\text{ }\mu\text{L}$. Quality control for total RNA samples was acquired using the total RNA Nanochip assay on an Agilent 210[®] Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

miRNA screening & RT-qPCR assays. MiRNA selection was based on a literature review englobing original studies about: (miRNA OR microRNA) AND (chronic pain OR osteoarthritis OR osteoarthrosis OR degenerative joint disease) AND (chronic pain OR nociceptive OR inflammatory OR neuropathic OR cancer OR cancerous) AND (spinal cord OR central nervous system). Fourteen miRNAs were chosen for expression screening in all spinal cord sample ($n = 6$ in each group). Conditions and tissues in which selected miRNA has been described are briefly presented in Table 1 (p.110) with respective references.

TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (#4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) was used for reverse transcription of total RNA samples and TaqMan[®] MicroRNA Assays kit (#4427975) was used with TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix (#4444556) for RT-qPCR amplification following manufacturer's instructions. Expression levels were normalized using miR-191 as reference, as suggested by TaqMan[®] technical guide, since its expression has been reported as consistent across several tissues^{69,70}. Fold change of miRNA expression was calculated on obtained comparative cycle threshold (Ct) RT-qPCR ratios which were calculated with an efficiency correction using the Pfaffl Method as previously described⁷¹.

Evaluation of stifle tissue

Right stifle joints of OA ($n = 12$) and Naïve ($n = 6$) rats were collected and dissected free of muscle immediately following sacrifice at D56. The stifle joints were fixed in 10% formaldehyde solution (pH 7.4) for at least 3 days.

Evaluation of macroscopic lesions

Examination of the right knee for morphological changes was performed by 2 independent observers under blinded conditions as previously described⁷². Macroscopic lesions of medial and lateral aspects of femoral condyles and tibial plateaus were characterized based on the surface area (size) of articular surface changes which were measured and expressed in mm². For each compartment, the macroscopic cartilage lesions size was reported on the total compartment size and expressed in percentage of cartilage

alteration. The total score was emitted as the mean of the four compartments with the standard error of the mean (SEM) for both groups.

Histological analysis

Joint tissues were decalcified and embedded in paraffin for histological evaluation. Serial sections were cut with a thickness of 5 μm for each stifle after a Safranin-O/Fast Green staining. Medial and lateral femoral condyles, as well as medial and lateral tibial plateaus were analyzed. Articular lesions were graded on a scale using a table modified from Mankin's score (mMs)^{73,74} by an independent observer blinded to the study. Severity of lesions ranged from 0 to 25 for each of the four compartments of the stifle. Structural changes were scored from 0 (normal) to 10 (highest surface irregularities) to assess chondral lesions, Safranin-O staining was evaluated to identify proteoglycan loss with a scale from 0 (no loss of staining) to 6 (loss of staining in all the articular cartilage by more than 50%), cluster formation was evaluated from a range of 0 (no cluster formation) to 3 (more than 8 clusters) and loss of chondrocytes was scored on 0 (normal) to 6 (diffuse loss of chondrocytes) scale. The sum of all four compartment scores was calculated (maximum 100) and was expressed in percentage of cartilage alterations.

Statistical analysis

All statistical analyses were achieved with a statistical software program (IBM® SPSS® Statistics Server version 25.0, New York, USA) with an alpha value set at 0.05.

The data averages of the 3 trials for SWB and PWT were calculated for each subject. Alteration of the RHL SWB and the RHP PWT were then analyzed from the average values collected for the ipsilateral (OA-affected) limb. Contralateral (left side) report was assessed by calculating the SWB and PWT asymmetry index (in percentage) from the ipsilateral to the contralateral hind limb, as followed:

$$((\%BW_{\text{right}} - \%BW_{\text{left}}) / [(\%BW_{\text{right}} + \%BW_{\text{left}}) \times 0.5]) \times 100$$

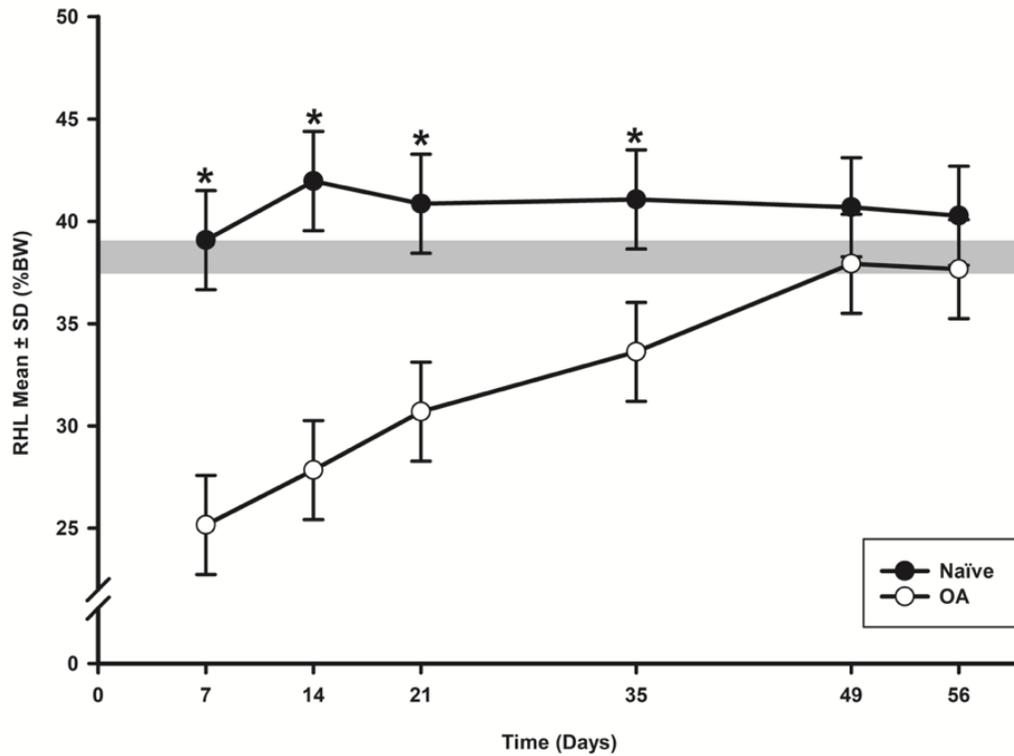
$$((PWT_{\text{right}} - PWT_{\text{left}}) / [(PWT_{\text{right}} + PWT_{\text{left}}) \times 0.5]) \times 100$$

Data of SWB, QSTs and asymmetry indexes were analyzed using general linear mixed models for repeated measures,¹⁰ and the normality of the outcomes was verified using the

Shapiro-Wilk test. The groups, days and their interactions (day \times group) were considered as fixed effects, with baseline measurement as covariate and using type-3 regressive covariance structure. Data are presented as the estimate mean (least square mean (LSM)) with 95% confidence limits (inferior and superior). Neuropeptides, epigenetics, macroscopic and histological joint data were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney-Wilcoxon test.

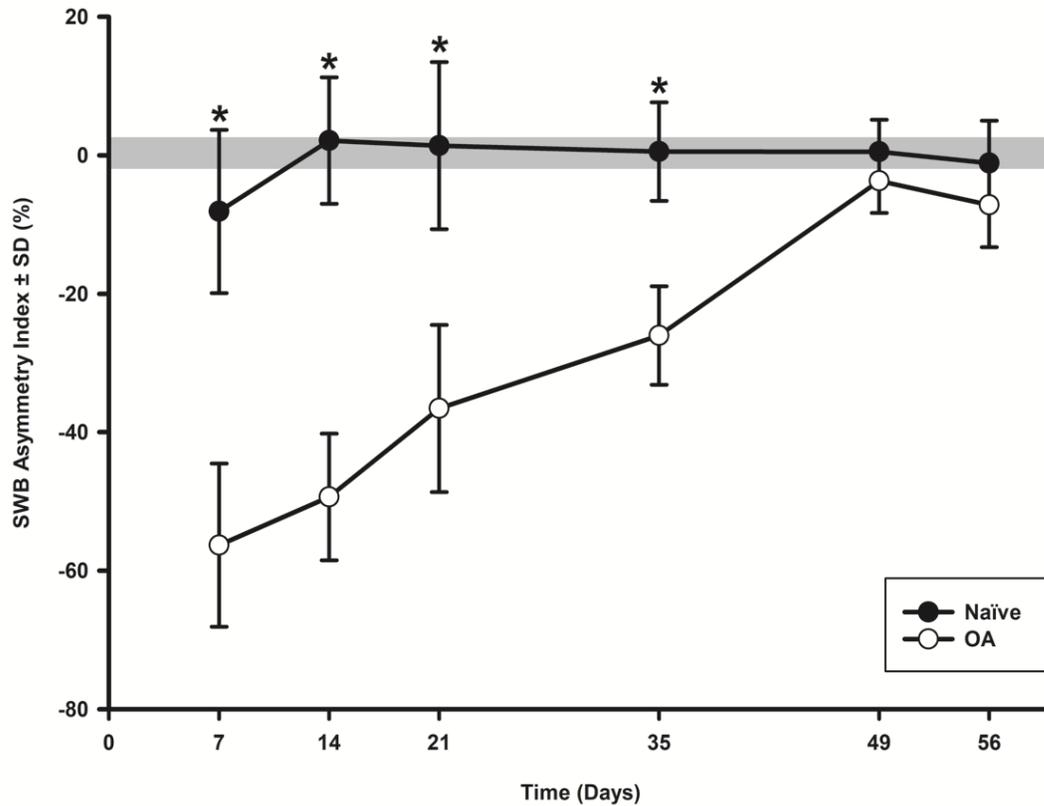
List of figures and tables with legends

Figure 1. Temporal evolution of static weight bearing (SWB) of ipsilateral (right) hind limb and temporal evolution of SWB asymmetry index in the osteoarthritis (OA) and the Naïve rat groups.



A) Temporal evolution of right hind limb (RHL) SWB (least square means \pm 95% confidence limit intervals). From D7 to D35 inclusively, the OA group showed decreased RHL force compared to the Naïve group ($\text{adj-}P < 0.05$). No significant inter-group difference was noted at D49 and D56. The mean(SD) of RHL SWB at baseline (D-1; 39.11(0.75)%BW for $n = 24$ rats) is represented by the horizontal gray zone.

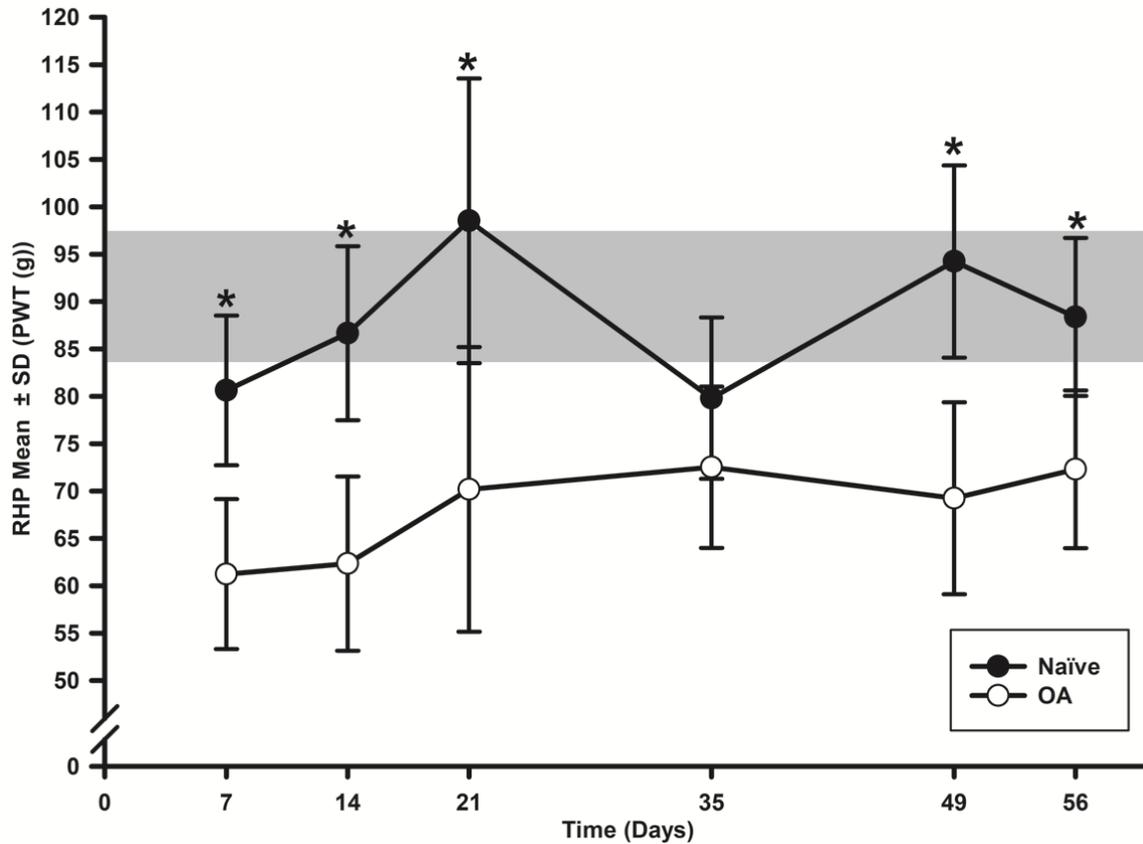
***Inter-group significant difference at each day ($\text{adj-}P < 0.05$).**



B) Temporal evolution of SWB asymmetry index from the ipsilateral (right) to the contralateral (left) hind limb (least square means \pm 95% confidence limit intervals). The OA group presented a marked contralateral report from D7 to D35 in comparison to the Naïve group ($P < 0.001$). The contralateral transfer then disappeared at D49 and D56 (adj- $P > 0.1$). The mean (SD) SWB asymmetry index at baseline (D-1; 0.31(2.51)%, $n = 24$) is represented by the horizontal gray zone.

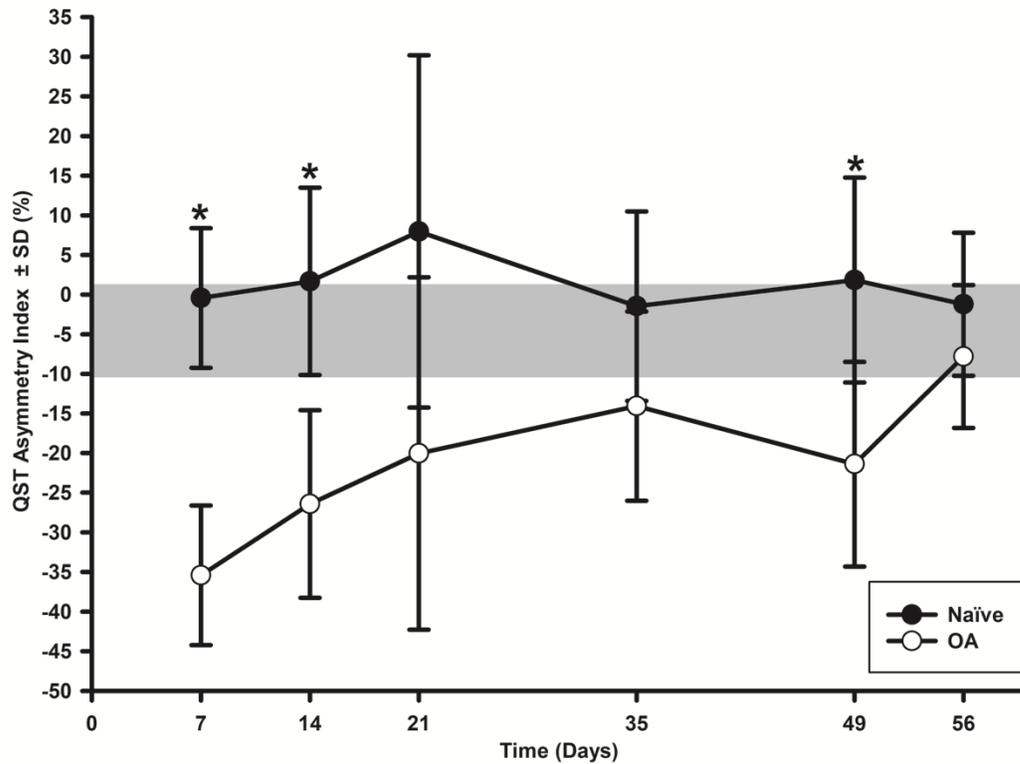
*Inter-group significant difference at each day (adj- $P < 0.05$).

Figure 2. Temporal evolution of the paw withdrawal threshold (PWT) of ipsilateral (right) hind paw and static quantitative sensory testing (QST) asymmetry index in the osteoarthritis (OA) and the Naïve rat groups.



A) Temporal evolution of the ipsilateral (right) hind paw (RHP) PWT (least square means \pm 95% confidence limit intervals). Allodynia in ipsilateral paw was present as soon as D7 in OA group, and maintained up to D56 ($P < 0.05$). No significant inter-group difference was noted at D35. The mean(SD) RHP PWT at baseline (D-1; 88.33(6.78) g for $n = 24$) is represented by the horizontal gray zone.

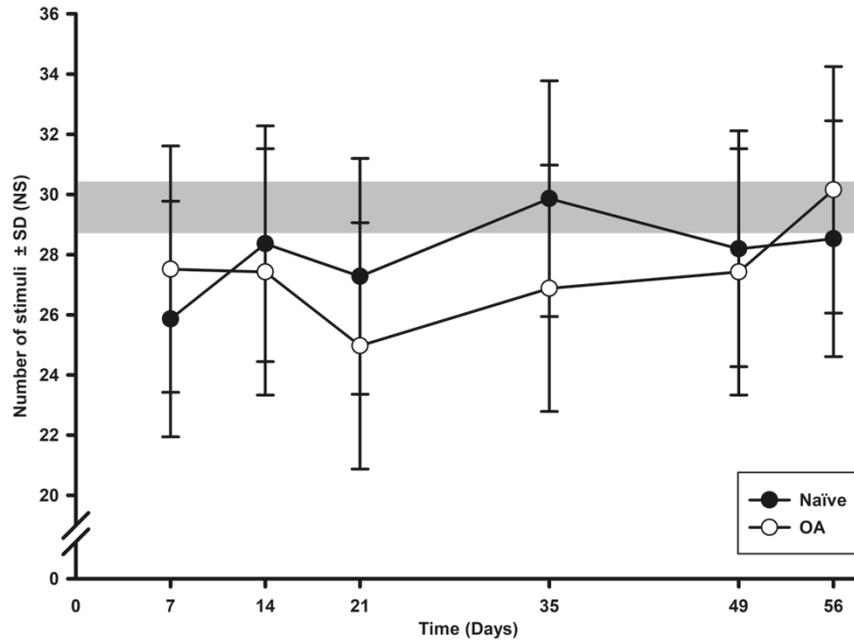
***Inter-group significant difference at each day (adj- $P < 0.05$).**



B) Temporal evolution of static QST asymmetry index from the ipsilateral (right) to the contralateral (left) hind paws over time after surgery (least square means \pm 95% confidence limit intervals). The OA group presented a marked ipsilateral to contralateral report from D7 to D14 and D49 in comparison to the Naïve group ($P < 0.015$). The mean(SD) static QST asymmetry index at baseline (D-1; $-4.60(5.90)\%$) is represented by the horizontal gray zone.

***Inter-group significant difference at each day (adj- $P < 0.05$).**

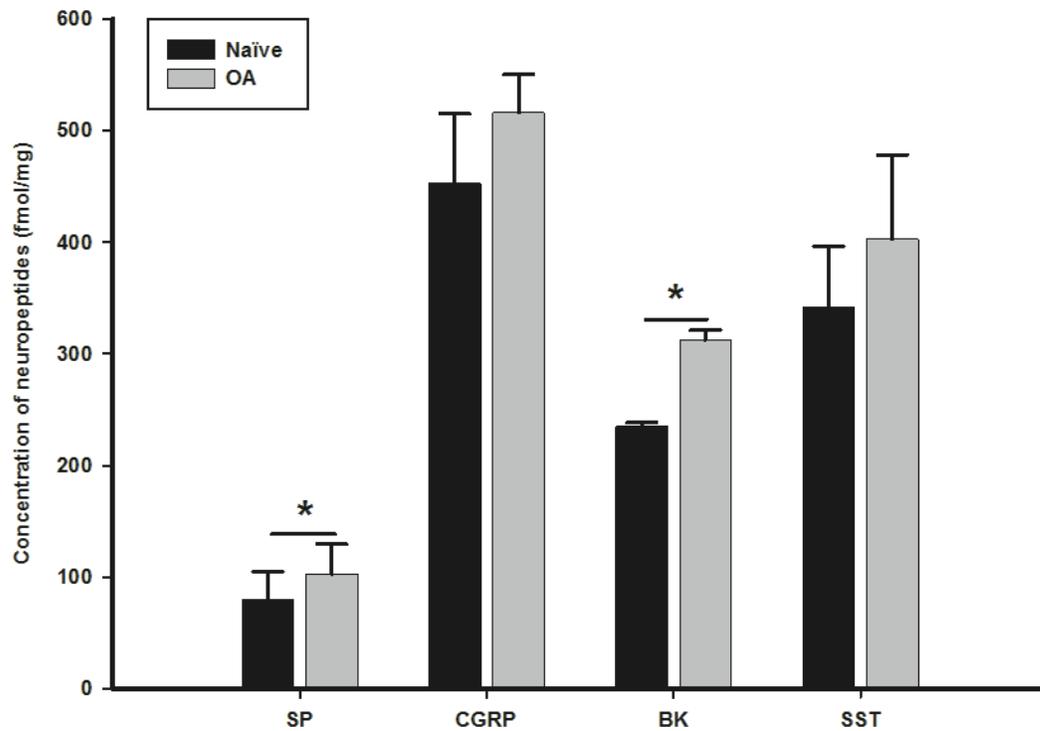
Figure 3. Evolution in time of response to mechanical temporal summation (RMTS) as number of stimuli required to induce a response in the Naïve and OA groups.



RMTS is expressed in number of stimuli (NS) needed to induce a pain behavioral response (least square means \pm 95% confidence limit intervals), with a maximal score of 30 NS. There was no significant difference at each timepoint ($\text{adj-}P > 0.3$) between Naïve and OA groups during the entire length of the study.

The mean \pm 95% confidence limit intervals at baseline (D-1 [28.70; 30.42] $n = 24$) is represented by the horizontal gray zone.

Figure 4. Spinal neuropeptides concentration mean (fmol/mg) \pm standard deviation (SD) of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), bradykinin (BK) and somatostatin (SST) at day (D) 56 post induction of osteoarthritis (OA) by CCLT-DMM surgery and regular exercise.



The CCLT-DMM surgery and exercise procedure induced a significant up-regulation at D56 of SP and BK in spinal cords of rats ($P = 0.002$). CGRP and SST were also up-regulated, however, not at a statistically significant level ($P = 0.093$ and 0.065 , respectively).

***Significant statistical inter-group difference for each neuropeptide.**

Table 1. Fold change (OA/Naïve) in expression of selected miRNAs for RT-qPCR screening in spinal cord 56 days after surgery and regular exercise

miRNA	Condition (Tissue)	References	^a Fold change OA/Naïve	^b p- value
miR-181b-5p	Inflammatory pain OA knee and facet joint Chronic visceral pain (SDH; 2,100 miRNAs screened in blood)	52-54,59	1.26	0.029
miR-1-3p	Neuropathic pain Inflammatory pain Cancer pain (DRG; SDH)	42,44	1.14	0.818
miR-21-5p	Neuropathic pain Inflammatory pain (DRG; CNS; exudates)	43,45,75	1.13	0.699
miR-219a-2-3p	Inflammatory pain (Exudates; SDH)	38,75	1.08	0.589
miR-146-3p	OA Inflammatory pain (DRG; SDH; synovial tissue)	15,37,55,75	1.07	0.589
miR-483-3p	OA Cancer pain (DRG; Articular cartilage)	42,56	1.02	1.000
miR-218a-1-3p	Neuropathic pain Cancer pain (DRG)	42,46	0.98	0.937
miR-106b-5p	Joint damage /inflammation (Articular cartilage)	57	0.97	1.000
miR-124-3p	Inflammatory pain (CNS; SDH)	40,41,47	0.94	0.818
miR-183-5p	Neuropathic pain Inflammatory pain (DRG)	39,48	0.94	0.485
miR-195-5p	Neuropathic pain Inflammatory pain (DRG; SDH)	49,50	0.94	1.000
miR-664-3p	CRPS (Blood)	76	0.87	0.177
miR-26a-5p	Joint damage (Articular cartilage)	56	0.86	0.310
miR-7b	Neuropathic pain Bone disorder (Osteoclasts; DRG)	51,77	0.83	0.240

Increase of miR-181b-5p in CCLT-DMM group is the only **inter-group** statistically significant **difference** in miRNA expression between the two groups ($P < 0.05$).

^aValues represent the fold change of the CCLT-DMM and Naïve groups (least square means \pm 95%) for miRNA expression normalized against housekeeping miR-191.

^bThe *P*-value was determined with a Mann Whithney U test.

miRNA micro-RNA; *OA* osteoarthritis; *SDH* spinal dorsal horn; *DRG* dorsal root ganglion; *CNS* central nervous system; *CRPS* complex regional pain syndrome.

Table 2. Macroscopic assessment of cartilage lesions and histological modified Mankin score (mMs) in percentage (%) of cartilage alterations of the tibial and femoral (medial & lateral) right stifle at sacrifice (D56)

	Naïve (n = 6)		OA (n = 12)		
Macroscopy ^b (%)	Mean	SEM	Mean	SEM	^c <i>P</i> -value
<i>Total score</i>	3.68	2.92	35.27	9.00	< 0.001
Histology ^a (mMs) ^b (%)	Mean	SEM	Mean	SEM	^c <i>P</i> -value
<i>Chondral lesions</i>	1.00	1.77	17.17	8.16	< 0.001
<i>Proteoglycan loss</i>	1.67	0.96	10.67	5.40	< 0.001
<i>Cluster formation</i>	0.17	0.41	4.42	2.10	< 0.001
<i>Chondrocytes loss</i>	0.00	0.00	1.58	2.80	0.02
<i>Total score</i>	2.83	0.98	34.25	11.06	< 0.001

^aMeasures were obtained for the two groups in percentage of cartilage alterations for the histological modified Mankin score (mMs) of both the medial and lateral sides of the tibia and femur in the right stifle at sacrifice (D56).

^bMeans and standard error of the mean (SEM) of the total score for the total of the four compartments are expressed in percentage.

^cOA induction by CCLT-CMM surgery and regular exercise caused statistically significant apparent cartilage lesions ($P < 0.001$) perceptible at histology and macroscopy assessment 56 days after the surgery as determined by Mann-Whitney *U* testing.

Authors' Contributions

Study concept and design: KAC, CO, JMP, JPP, AB and ET. Conception of OA pain model: KAC, CO, BL and ET. Technical manipulations: KAC, DA, MT, EB, FB and AB. Analysis and interpretation of published data: KAC, EB, CO, AB and ET. First draft: KAC and ET. Final draft and revising of the article: all co-authors, with the final approval of the submitted version.

References

- 1 GBD. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1789-1858 (2018).
- 2 Hunter, D. J., Schofield, D. & Callander, E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 437-441, doi:10.1038/nrrheum.2014.44 (2014).
- 3 Felson, D. T. & Neogi, T. Challenges for osteoarthritis trials. *Arthritis & Rheum* **70**, 1175-1181 (2018).
- 4 Malfait, A. M. & Schnitzer, T. J. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **9**, 654-664, doi:10.1038/nrrheum.2013.138 (2013).
- 5 Eitner, A., Hofmann, G. O. & Schaible, H. G. Mechanisms of Osteoarthritic Pain. Studies in Humans and Experimental Models. *Front Mol Neurosci* **10**, 349, doi:10.3389/fnmol.2017.00349 (2017).
- 6 Fu, K., Robbins, S. R. & McDougall, J. J. Osteoarthritis: the genesis of pain. *Rheumatology (Oxford)* **57**, iv43-iv50, doi:10.1093/rheumatology/kex419 (2018).
- 7 Mogil, J. S. Laboratory environmental factors and pain behavior: the relevance of unknown unknowns to reproducibility and translation. *Lab Anim (NY)* **46**, 136-141, doi:10.1038/labam.1223 (2017).
- 8 Im, H. J. *et al.* Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* **62**, 2995-3005, doi:10.1002/art.27608 (2010).
- 9 Barve, R. A. *et al.* Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 1190-1198, doi:10.1016/j.joca.2007.03.014 (2007).
- 10 Otis, C. *et al.* Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. *Arthritis Res Ther* **18**, 150, doi:10.1186/s13075-016-1047-5 (2016).
- 11 Hummel, M. & Whiteside, G. T. Measuring and realizing the translational significance of preclinical in vivo studies of painful osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **25**, 376-384, doi:10.1016/j.joca.2016.08.007 (2017).

- 12 Gervais, J. A. *et al.* Osteoarthritic pain model influences functional outcomes and spinal neuropeptidomics: A pilot study in female rats. *Canadian Journal of Veterinary Research* **83**, 133-141 (2019).
- 13 McDonald, M. K. & Ajit, S. K. MicroRNA biology and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* **131**, 215-249, doi:10.1016/bs.pmbts.2014.11.015 (2015).
- 14 Gold, M. S. & Gebhart, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* **16**, 1248-1257, doi:10.1038/nm.2235 (2010).
- 15 Li, X. *et al.* Altered spinal microRNA-146a and the microRNA-183 cluster contribute to osteoarthritic pain in knee joints. *J Bone Miner Res* **28**, 2512-2522, doi:10.1002/jbmr.2002 (2013).
- 16 Otis, C. *et al.* Spinal neuropeptide modulation, functional assessment and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Neuropeptides* **65**, 56-62, doi:10.1016/j.npep.2017.04.009 (2017).
- 17 Klinck, M. P. *et al.* Translational pain assessment: could natural animal models be the missing link? *Pain* **158**, 1633-1646, doi:10.1097/j.pain.0000000000000978 (2017).
- 18 Little, C. B. & Smith, M. M. Animal models of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rev* **4**, 1-8 (2008).
- 19 Otis, C. *et al.* Sensitivity of functional targeted neuropeptide evaluation in testing pregabalin analgesic efficacy in a rat model of osteoarthritis pain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Accepted for publication (CEPP-18-0539R1) (2019).
- 20 Bouet, E. *et al.* Effect of exercise and analgesia on sensory sensitivity and structural alterations in a surgical rat model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* (2019).
- 21 Harvey, V. L. & Dickenson, A. H. Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain* **5**, 18, doi:10.1186/1744-8069-5-18 (2009).
- 22 Guillot, M. *et al.* Evoked Temporal Summation in Cats to Highlight Central Sensitization Related to Osteoarthritis-Associated Chronic Pain: A Preliminary Study. *PLoS ONE* **9**, doi:10.1371/journal.pone.0097347 (2014).
- 23 Woolf, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* **152**, S2-15, doi:10.1016/j.pain.2010.09.030 (2011).
- 24 Herrero, J. F., Laird, J. M. A. & Lopez-Garcia, J. A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Progress in Neurobiology* **61**, 169-203 (2000).
- 25 Woolf, C. J. Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* **66**, 105-108 (1996).
- 26 Nouri, K. H. *et al.* in *Essentials of Pain Medicine* (eds H. Benzon *et al.*) Ch. 2, 11-20.e12 (Elsevier Inc., 2018).
- 27 Ferland, C. E., Pailleux, F., Vachon, P. & Beaudry, F. 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, doi:10.1016/j.npep.2011.07.007 (2011).
- 28 Prescott, S. A. Synaptic inhibition and disinhibition in the spinal dorsal horn. *Prog Mol Biol Transl Sci* **131**, 359-383 (2015).

- 29 Oku, R. *et al.* Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res* **403**, 350-354 (1987).
- 30 Rialland, P. *et al.* Association between sensitisation and pain-related behaviours in an experimental canine model of osteoarthritis. *Pain* **155**, 2071-2079, doi:10.1016/j.pain.2014.07.017 (2014).
- 31 Rialland, P. *et al.* Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospective, blinded, randomized, and controlled study focusing on spinal pain proteomics. *J Dairy Sci* **97**, 2118-2134, doi:10.3168/jds.2013-7142 (2014).
- 32 Pinter, E., Helyes, Z. & Szolcsanyi, J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* **112**, 440-456, doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.010 (2006).
- 33 Wang, H. *et al.* Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* **25**, 7986-7992, doi:10.1523/JNEUROSCI.2393-05.2005 (2005).
- 34 Ferreira, J. *et al.* 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**, 1188-1197, doi:10.1016/s0028-3908(02)00311-8 (2002).
- 35 Kohno, T. *et al.* Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci* **28**, 4533-4540, doi:10.1523/JNEUROSCI.5349-07.2008 (2008).
- 36 Tramullas, M. *et al.* MicroRNA-30c-5p modulates neuropathic pain in rodents. *Science Translational Medicine* **10**, 1-13 (2018).
- 37 Li, X. *et al.* MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene* **480**, 34-41, doi:10.1016/j.gene.2011.03.003 (2011).
- 38 Pan, Z. *et al.* Epigenetic modification of spinal miR-219 expression regulates chronic inflammation pain by targeting CaMKIIgamma. *J Neurosci* **34**, 9476-9483, doi:10.1523/JNEUROSCI.5346-13.2014 (2014).
- 39 Bai, G., Ambalavanar, R., Wei, D. & Dessem, D. Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain. *Mol Pain* **3**, 15, doi:10.1186/1744-8069-3-15 (2007).
- 40 Kynast, K. L., Russe, O. Q., Moser, C. V., Geisslinger, G. & Niederberger, E. Modulation of central nervous system-specific microRNA-124a alters the inflammatory response in the formalin test in mice. *Pain* **154**, 368-376, doi:10.1016/j.pain.2012.11.010 (2013).
- 41 Willemen, H. *et al.* MicroRNA-124 as a novel treatment for persistent hyperalgesia. *Journal of Neuroinflammation* **9** (2012).
- 42 Bali, K. K. *et al.* Genome-wide identification and functional analyses of microRNA signatures associated with cancer pain. *EMBO Mol Med* **5**, 1740-1758, doi:10.1002/emmm.201302797 (2013).
- 43 Bhalala, O. G. *et al.* microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury. *J Neurosci* **32**, 17935-17947, doi:10.1523/JNEUROSCI.3860-12.2012 (2012).

- 44 Kusuda, R. *et al.* Differential expression of microRNAs in mouse pain models. *Mol Pain* **7**, 17, doi:10.1186/1744-8069-7-17 (2011).
- 45 Sakai, A. & Suzuki, H. Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **435**, 176-181, doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.089 (2013).
- 46 von Schack, D. *et al.* Dynamic changes in the microRNA expression profile reveal multiple regulatory mechanisms in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *PLoS ONE* **6**, e17670, doi:10.1371/journal.pone.0017670 (2011).
- 47 Nakanishi, K. *et al.* Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal Cord* **48**, 192-196, doi:10.1038/sc.2009.89 (2010).
- 48 Aldrich, B. T., Frakes, E. P., Kasuya, J., Hammond, D. L. & Kitamoto, T. Changes in expression of sensory organ-specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation. *Neuroscience* **164**, 711-723, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.033 (2009).
- 49 Yu, B. *et al.* Profile of microRNAs following rat sciatic nerve injury by deep sequencing: implication for mechanisms of nerve regeneration. *PLoS ONE* **6**, e24612, doi:10.1371/journal.pone.0024612 (2011).
- 50 Shi, G. *et al.* Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury. *Glia* **61**, 504-512 (2013).
- 51 Sakai, A. *et al.* miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain* **136**, 2738-2750, doi:10.1093/brain/awt191 (2013).
- 52 Nakamura, A. *et al.* microRNA-181a-5p antisense oligonucleotides attenuate osteoarthritis in facet and knee joints. *Ann Rheum Dis* **78**, 111-121, doi:10.1136/annrheumdis-2018-213629 (2019).
- 53 Nakamura, A. *et al.* Identification of microRNA-181a-5p and microRNA-4454 as mediators of facet cartilage degeneration. *JCI Insight* **1**, e86820, doi:10.1172/jci.insight.86820 (2016).
- 54 Song, J. *et al.* MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochem Biophys Res Commun* **431**, 210-214, doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.133 (2013).
- 55 Yamasaki, K. *et al.* Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* **60**, 1035-1041, doi:10.1002/art.24404 (2009).
- 56 Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P. & Tsezou, A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* **3**, e3740, doi:10.1371/journal.pone.0003740 (2008).
- 57 Tao, Y. *et al.* Downregulation of miR-106b attenuates inflammatory responses and joint damage in collagen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **56**, 1804-1813, doi:10.1093/rheumatology/kex233 (2017).
- 58 Kung, L. H. W. *et al.* Utility of circulating serum miRNAs as biomarkers of early cartilage degeneration in animal models of post-traumatic osteoarthritis and inflammatory arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **25**, 426-434, doi:10.1016/j.joca.2016.09.002 (2017).

- 59 Sengupta, J. N. *et al.* MicroRNA-mediated GABA Aalpha-1 receptor subunit down-regulation in adult spinal cord following neonatal cystitis-induced chronic visceral pain in rats. *Pain* **154**, 59-70, doi:10.1016/j.pain.2012.09.002 (2013).
- 60 Zhao, C. *et al.* Computational prediction of MicroRNAs targeting GABA receptors and experimental verification of miR-181, miR-216 and miR-203 targets in GABA-A receptor. *BMC Res Notes* **5**, 91, doi:10.1186/1756-0500-5-91 (2012).
- 61 Zhou, L. *et al.* Identification of transthyretin as a novel interacting partner for the delta subunit of GABAA receptors. *PLoS One* **14**, e0210094, doi:10.1371/journal.pone.0210094 (2019).
- 62 Lotz, M. K. *et al.* Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum* **62**, 2206-2218, doi:10.1002/art.27528 (2010).
- 63 Xia, B. *et al.* Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int* **95**, 495-505, doi:10.1007/s00223-014-9917-9 (2014).
- 64 Cruz-Almeida, Y. & Fillingim, R. B. Can quantitative sensory testing move us closer to mechanism-based pain management? *Pain medicine* **15**, 61-72, doi:10.1111/pme.12230 (2013).
- 65 Mackey, I. G., Dixon, E. A., Johnson, K. & Kong, J. T. Dynamic Quantitative Sensory Testing to Characterize Central Pain Processing. *J Vis Exp*, doi:10.3791/54452 (2017).
- 66 Arendt-Nielsen, L. & Yarnitsky, D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* **10**, 556-572, doi:10.1016/j.jpain.2009.02.002 (2009).
- 67 Dixon MJ, T. P., Slingsby L, Hoffmann MV, Kastner SB, et al. . A small, silent, low friction, linear actuator for mechanical nociceptive testing in veterinary research. . *Lab Anim* **44**, 247–253 (2010).
- 68 Beaudry, F. Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry-based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Anal Biochem* **407**, 290-292, doi:10.1016/j.ab.2010.08.017 (2010).
- 69 Peltier, H. J. & Latham, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* **14**, 844-852, doi:10.1261/rna.939908 (2008).
- 70 Schwarzenbach, H., da Silva, A. M., Calin, G. & Pantel, K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* **61**, 1333-1342, doi:10.1373/clinchem.2015.239459 (2015).
- 71 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45 (2001).
- 72 Fernandes, J. C. *et al.* Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* **38**, 1290-1303 (1995).
- 73 Colombo, C. *et al.* A new model of osteoarthritis in rabbits. II. Evaluation of anti-osteoarthritic effects of selected antirheumatic drugs administered systemically. *Arthritis Rheum* **26**, 1132-1139 (1983).
- 74 Gerwin, N., Bendele, A. M., Glasson, S. S. & Carlson, C. S. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage* **18 Suppl 3**, S24-34, doi:10.1016/j.joca.2010.05.030 (2010).

- 75 Recchiuti, A., Krishnamoorthy, S., Fredman, G., Chiang, N. & Serhan, C. N. MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvins and miRNA circuits. *The FASEB Journal* **25**, 544-560 (2011).
- 76 Orlova, I. *et al.* MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome. *Journal of Translational Medicine* **9**, 195 (2011).
- 77 Dou, C. *et al.* MiR-7b directly targets DC-STAMP causing suppression of NFATc1 and c-Fos signaling during osteoclast fusion and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 1084-1096, doi:10.1016/j.bbagr.2014.08.002 (2014).

Section 4 : Discussion générale

1. Modèle de recherche translationnelle dans la douleur chronique

Les buts premiers de la recherche sur la douleur sont d'améliorer notre compréhension de pathologie de la douleur et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires dans le but de mieux la contrôler. En fait, malgré les importantes avancées scientifiques et technologiques, parallèlement à l'augmentation considérable des investissements monétaires attribués à ce domaine d'étude, le développement des drogues analgésiques s'avère fréquemment un échec en essai clinique (Klinck et al., 2017; Lascelles et al., 2018). Les modèles animaux de douleur ont évidemment contribué énormément à notre compréhension de mécanismes pathologiques. Cependant, leur capacité à prédire avec certitude ce qui survient chez une autre espèce, notamment l'humain, est controversée (Klinck et al., 2017; van der Worp et al., 2010). Cette « crise translationnelle » survenant dans la recherche en biomédecine, et spécialement dans le domaine de la douleur, est possiblement en partie alimentée par une reproductibilité déficiente des essais précliniques (Klinck et al., 2017). En ce qui concerne la douleur chronique, l'utilisation de méthodes d'évaluation de la douleur ayant une validité discutable ainsi que le manque d'exactitude des modèles animaux à reproduire adéquatement les pathologies étudiées pourraient notamment expliquer la problématique (Lascelles et al., 2018; Mogil et al., 2010; van der Worp et al., 2010). De plus, l'hypothèse voulant qu'une place trop importante est accordée aux réponses de retrait évoquées (réflexes) dans l'étude de l'arthrose dans les modèles animaux a été proposée. Le développement d'outils d'évaluation probants, tels la mesure de la douleur spontanée en continu, pourrait améliorer la translation des données expérimentales vers la clinique (Mogil & Crager, 2004; Otis et al., 2016).

Bien que les modèles d'arthrose survenant naturellement soient reconnus comme reproduisant le plus fidèlement les changements physiopathologiques de l'arthrose clinique, ils présentent certains désavantages expérimentaux, notamment la grande variabilité dans le développement de la pathologie ainsi que la survenue sur une longue période de la maladie (Moreau et al., 2013; Otis et al., 2016). À l'inverse, les modèles chimiques d'arthrose entraînent une progression d'arthrose considérablement rapide, nécessitent peu de procédures invasives et

permettent une standardisation et une homogénéité supérieure des sujets (Otis et al., 2016). Or, les modèles chimiques tels le modèle MIA, présentent un développement accéléré de l'arthrose en comparaison à l'arthrose naturelle (Hummel & Whiteside, 2017) et reposent sur des mécanismes pathologiques d'autant plus différents (Gervais et al., 2019). L'impermanence de ce modèle est d'autant plus une limitation dans l'évaluation, en particulier lorsqu'elle ne permet une évaluation qu'à un certain point dans le temps (Hummel & Whiteside, 2017) et le profil génétique des sujets différerait de manière substantielle à celui des humains atteints d'arthrose (Barve et al., 2007). Ces limitations pourraient ainsi nuire à la capacité du modèle à prédire l'effet d'agents analgésiques. En réponse à ceci, nous avons donc conduit une étude pilote chez le rat, visant à comparer plusieurs modèles d'arthrose chirurgicale au modèle MIA, en ce qui concerne leur influence au niveau de la neuropeptidomique fonctionnelle. Au final, le modèle CCLT-DMM a été identifié comme ayant le plus de potentiel pour représenter fidèlement la douleur et la composante structurelle de l'arthrose (Gervais et al., 2019).

Alors que les changements au niveau de l'expression protéique sont bien connus comme étant impliqués dans les processus de sensibilisation nociceptive survenant lors de pathologies de douleur chronique telles que l'arthrose, l'épigénétique se présente comme une nouvelle branche dans l'étude de ces maladies ayant un immense potentiel d'apport d'informations supplémentaires. En effet, les mécanismes épigénétiques visent à réguler l'expression du génome sans toutefois modifier la séquence primaire de l'ADN (Geranton & Tochiki, 2015). Ainsi, dans le cadre de recherches s'attardant à des maladies où l'altération de la régulation génomique mène à des changements dans l'expression protéique, l'étude des mécanismes épigénétiques permettrait d'apporter une meilleure compréhension des processus pathologiques impliqués. En réponse à la problématique de la « crise translationnelle », l'hypothèse évoquée était donc que le modèle CCLT-DMM d'arthrose rongeur permettrait potentiellement l'identification de marqueurs neuro-épigénétiques concomitants avec les changements de neuropeptidomique et fonctionnels préalablement notés. La validation d'une série de méthodes d'évaluation de la douleur arthrosique voulait ainsi permettre l'élévation de notre compréhension des diverses composantes impliquées dans les mécanismes de la douleur arthrosique.

Afin de répondre à cet objectif, un groupe de rats arthrosiques (OA) ayant subi une chirurgie CCLT-DMM au genou droit était comparé à un groupe d'individus naïfs (ne subissant aucune intervention chirurgicale). Du coup, puisque l'étude menée au cours de ce projet de maîtrise avait un but d'exploration, le groupe naïf voulait permettre la mise en évidence marquée de l'effet de la chirurgie sur l'articulation et sur la mise en place des phénomènes de douleur. Ainsi, les deux groupes étaient soumis à des évaluations fonctionnelles de la douleur, alors que des analyses moléculaires subséquentes de neuropeptidomique et de neuro-épigénétique ont d'autant plus été réalisées.

Toujours, au cours de l'étude relative à ce projet de maîtrise, les évaluations fonctionnelles de la douleur ont été menées uniquement par des femmes, puisqu'il est suggéré que les hommes pourraient potentiellement induire une analgésie liée au stress chez les rongeurs. En effet, chez ces espèces, il a été observé que les mâles seraient plus sensibles à l'odeur d'autres mâles, incluant les hommes, ce qui leur causerait davantage de stress, induisant par le fait même une analgésie plus importante que les femelles (Otis et al., 2016; Sorge et al., 2014). Bien que l'effet du sexe des sujets mérite davantage d'étude, d'autres raisons supportent le choix d'avoir inclus uniquement des sujets femelles dans l'étude. En effet, les mécanismes endogènes de modulation de la douleur seraient notamment affectés par le dimorphisme sexuel (Gaumond, Spooner, & Marchand, 2007) et les hormones (Coulombe, Spooner, Gaumond, Carrier, & Marchand, 2011; Liu et al., 2014; Mogil, 2012). Par ailleurs, chez l'humain, il est à noter que les données actuelles suggèrent que les femmes sont plus atteintes que les hommes par la douleur chronique (Fillingim, King, Ribeiro-Dasilva, Rahim-Williams, & Riley, 2009; Mogil, 2012; Mogil et al., 2010). Nous considérons donc qu'il est important de prendre en compte la réalité épidémiologique de la prévalence de la maladie dans la sélection des sujets du modèle animal. En outre, afin de limiter la variabilité des résultats qui pourrait être associée au cycle œstral (Mogil, 2012), toutes les rattes ont subi une ovariectomie avant le début de l'étude. Enfin, afin de valider l'efficacité de la méthode chirurgicale CCLT-DMM à induire l'arthrose au niveau du grasset des rattes, des analyses macroscopiques et histologiques ont été réalisées sur les articulations lésées prélevées au moment de l'euthanasie.

2. Validation d'un panel de méthodes d'évaluation de la douleur arthrosique chez le rongeur

Alors que l'arthrose est une maladie dont la physiopathologie n'est que partiellement comprise, son étiologie est maintenant considérée comme étant multifactorielle alors qu'elle implique non seulement une atteinte des tissus articulaires, mais également un déséquilibre au niveau des systèmes inflammatoires et immunitaires menant ultimement à une altération de la fonction du système nerveux. Avec le désir d'en comprendre davantage sur cette pathologie complexe, il est essentiel de développer des modèles expérimentaux reproduisant fidèlement la maladie ainsi que des méthodes rigoureuses d'évaluation de la douleur arthrosique.

Or, il est ici suggéré qu'une combinaison de multiples méthodes d'évaluation permettrait la caractérisation plus valide de la douleur engendrée par le modèle expérimental. En effet, alors que les évaluations fonctionnelles de la douleur, ainsi que les évaluations structurelles de l'articulation, permettent de relever les dommages directement liés aux modifications articulaires, les analyses moléculaires, réalisées notamment au niveau spinal, permettraient de démontrer la présence de changements au niveau du système nerveux qui expliqueraient d'autant plus la douleur attribuée à cette maladie.

En effet, Fusco et *al.* (2017) ont su relever dans une revue de la littérature plusieurs études supportant la présence neuroinflammation spinale et supraspinale concomitante aux maladies articulaires dégénératives (Fusco et al., 2017). Chez l'humain notamment, des études ont su démontrer la corrélation entre une douleur plus grande chez les patients et un plus grand niveau de sensibilisation à la douleur évaluée par des évaluations fonctionnelles de douleur ainsi que selon des biomarqueurs sérologiques spécifiques (Arendt-Nielsen et al., 2014; Arendt-Nielsen et al., 2010). En ce qui concerne les modèles animaux, l'analyse des tissus nerveux dans la moelle épinière peut évidemment être réalisée plus aisément. Ainsi des études ont pu démontrer la corrélation entre l'atteinte des cellules nerveuses et les dommages articulaires (Bao et al., 2001; Miller, Wetter, Jarvis, & Bitner, 2013; Nieto, Clark, Grist, Chapman, & Malcangio, 2015). Par exemple, dans un modèle d'arthrose MIA chez le rat, 28 jours après l'induction de l'arthrose, l'activation de la microglie était significativement corrélée avec la présence d'allodynie distale (Sagar et al., 2011).

2.1. Évaluations fonctionnelles de la douleur

La mesure directe de la douleur chez l'animal est typiquement considérée comme étant impossible. L'étude des comportements associés à la douleur, par exemple le retrait ou la fuite face à un stimulus nociceptif, permet cependant d'obtenir des renseignements sur l'importance et la portée de cette douleur. Ainsi, plusieurs évaluations fonctionnelles de la douleur ont été développées afin de permettre l'observation de ces comportements. Également, certaines de ces évaluations offrent la possibilité de quantifier la réponse comportementale associée à la douleur, permettant alors d'évaluer objectivement le niveau de douleur de ces patients avec lesquels il nous est impossible de communiquer verbalement (Deuis et al., 2017).

Il est possible de diviser les évaluations fonctionnelles de la douleur en deux catégories basées sur le type de réponse primaire obtenue, c'est-à-dire une réponse réflexe ou non, ou encore selon que le comportement associé à la douleur évoquée est induit par un stimulus ou non. Les mesures de douleur basées sur une réponse réflexe, ou de douleur induite par un stimulus, évaluent le comportement suscité suite à l'application de stimuli thermiques, mécaniques ou électriques (Deuis et al., 2017; Gregory et al., 2013). Ces évaluations, qui incluent notamment l'esthésiomètre von Frey, activent en fait les nocicepteurs au site évalué pour induire une réponse motrice réflexe localisée. Ces réponses surviennent donc généralement sans activation supraspinale, mais peuvent toutefois être modifiées par diverses structures supraspinales. L'une des problématiques en cause dans l'échec de la translation des études expérimentales vers la clinique serait notamment la trop grande importance accordée aux évaluations mesurant la réponse réflexe de la douleur. Ainsi, les mesures évaluant la douleur indépendamment de la réponse réflexe, telles que les évaluations de réponses opérantes, les évaluations comportementales de douleur spontanée et les mesures de qualité de vie ou d'activité physique, seraient nécessaires pour compléter les évaluations de douleur puisqu'elles impliquent une intégration supraspinale. Ce faisant, cela contribue alors à une meilleure compréhension des mécanismes corticaux et de modulation de la douleur différents (Gregory et al., 2013).

Enfin, il est ultimement recommandé d'utiliser plus d'une méthode d'évaluation fonctionnelle de la douleur pour obtenir une translation plus efficace des résultats expérimentaux vers la clinique (Gregory et al., 2013). L'expérience de douleur décrite chez

l'humain est composée d'une variété de stimuli et de mécanismes moléculaires, et implique diverses composantes (sensorielles, motrices, émotionnelles, *etc.*). L'utilisation d'une combinaison de méthodes d'évaluation permet donc de prendre en compte cette complexité associée à la douleur lors de l'évaluation de celle-ci pour un modèle animal donné (Deuis et al., 2017).

2.1.1. Évaluation de la distribution pondérale du poids : *Static Weight Bearing (SWB)*

La mesure de distribution pondérale du poids permet d'évaluer l'altération de la biomécanique de l'articulation, et peut également indiquer une préférence pour le soulagement du membre douloureux (O'Brien et al., 2017). En effet, une distribution inégale du poids entre le membre ipsilatéral et contralatéral peut être interprétée comme étant un ajustement naturel corrélable avec le degré de nociception perçue (Deuis et al., 2017). Le port du poids sur les membres postérieurs ne génère normalement pas de douleur ou d'inconfort chez le rat. Ainsi, une asymétrie dans le port du poids pourrait être considérée comme de l'allodynie mécanique, suggérant par le fait même la présence d'une sensibilisation centrale (Gervais et al., 2019). Cette évaluation, qui est réalisée sans l'induction d'un stimulus nociceptif, a été étudiée dans plusieurs modèles expérimentaux incluant le modèle MIA d'arthrose induite, le modèle de douleur induite par le cancer des os, le modèle d'inflammation induite par la carragénine et le modèle neuropathique de lésion par constriction du nerf sciatique (Deuis et al., 2017). Les évaluations de distribution pondérale du poids démontrent d'ailleurs une forte reproductibilité (O'Brien et al., 2017).

L'étude récente de Gervais et *al.* (2019) comparant le modèle chimique MIA d'induction d'arthrose chez le rat à divers modèles chirurgicaux, dont le modèle combo CCLT-DMM, a permis l'observation d'un transfert de poids significatif du membre ipsilatéral vers le membre contralatéral. Ce phénomène s'installait rapidement soit dès le 3^{ème} jour suivant l'induction de l'arthrose par l'injection de MIA. Cependant, cette asymétrie dans la distribution pondérale du poids fut brève, ne persistant pas au-delà du 7^{ème} jour (Gervais et al., 2019). À l'inverse, les rats du modèle combo CCLT-DMM ont démontré une asymétrie significative plus tardivement soit jusqu'au 28^{ème} jour suivant la chirurgie. Ceci a d'ailleurs permis de démontrer que le modèle

CCLT-DMM induisait des dommages plus progressifs et persistants, de même qu'une douleur moins précoce et intense que le modèle MIA..

Les résultats de l'étude actuelle ont permis de démontrer la persistance d'un inconfort important au niveau du membre ipsilatéral chez les rats, persistant jusqu'à 35 jours suite à la chirurgie CCLT-DMM d'induction d'arthrose. En effet, le transfert de poids noté chez ces individus OA en comparaison avec ceux du groupe naïf suggère, tel qu'évoqué précédemment, la mise en place d'allodynie mécanique chez ces individus.

2.1.2. Test sensoriel quantitatif statique : Stimulations mécaniques tactiles – Esthésiomètre *von Frey*

Le retrait d'un membre en réponse à un stimulus est un comportement associé à la douleur fréquemment évalué afin de déterminer si l'animal présente de l'allodynie et/ou de l'hyperalgésie, soit des indicateurs de sensibilisation sensorielle. En effet, on considère qu'il y a présence d'allodynie chez un animal si celui-ci cherche à se retirer d'un stimulus normalement toléré par un individu sain. De manière semblable, si un animal exagère son comportement de retrait suite à l'induction d'un stimulus nocif, l'hyperalgésie sera considérée (Deuis et al., 2017). L'endroit où est appliqué un stimulus tactile engendrant une hypersensibilité, donne par ailleurs des informations supplémentaires quant à la localisation des voies de douleur impliquées dans la sensibilisation. Alors qu'un changement de seuil ou une réponse à un stimulus au site de la lésion indiquera la présence d'hyperalgésie/allodynie primaire, un changement de sensibilité à un site externe à la lésion (et sain) est considéré comme de l'hyperalgésie/allodynie secondaire (Gregory et al., 2013).

L'esthésiomètre von Frey électronique est un appareil d'esthésiométrie qui permet la mesure de l'allodynie tactile secondaire (O'Brien et al., 2017). En effet, le filament de von Frey stimule la surface plantaire du membre de l'animal, ce qui correspond à un site distant à la lésion primaire. De surcroît, l'allodynie secondaire est une manifestation fortement associée à la présence d'une sensibilisation des neurones de la moelle épinière ou de neurones supérieurs du système nerveux central (Gregory et al., 2013). Par ailleurs, cette évaluation sensorielle quantitative statique est peu affectée par le biais de l'évaluateur, détecte peu de faux positifs et

nécessite un conditionnement minimal de l'animal, ce qui la rend d'autant plus intéressante dans l'étude de la douleur chronique (O'Brien et al., 2017; Otis et al., 2016).

Les résultats obtenus pour le test sensoriel quantitatif statique du von Frey démontrent une persistance intéressante de l'allodynie secondaire au niveau du membre ipsilatéral des animaux dont l'arthrose a été induite chirurgicalement par la méthode combo CCLT-DMM. Tant les résultats obtenus par l'étude pilote de Gervais et *al.* (2019), que les résultats de la présente étude indiquent une différence significative du seuil de retrait du membre arthrosique sur la quasi-totalité de la durée de l'étude en comparaison avec le seuil obtenu avant la chirurgie (baseline). Cette allodynie secondaire concorde d'ailleurs approximativement avec l'allodynie mécanique notée à l'évaluation de la distribution pondérale du poids, soulignant possiblement la mise en place d'une sensibilisation centrale notable chez les rats du groupe OA. En outre, l'allodynie secondaire observée chez les individus du groupe OA peut faire penser au phénomène de douleur référée rapportée chez les patients arthrosiques humains (Bajaj, Bajaj, Graven-Nielsen, & Arendt-Nielsen, 2001; Harvey & Dickenson, 2009). Ce dernier phénomène est une douleur ressentie par ces patients à un site distant de la lésion primaire (Domenech-Garcia, Palsson, Herrero, & Graven-Nielsen, 2016). Ceci démontre notamment la capacité du modèle chirurgical CCLT-DMM à reproduire avec validité cet aspect de la physiopathologie de la maladie.

2.1.3. Test sensoriel quantitatif dynamique : *Response to mechanical temporal summation (RMTS)*

La réponse à la sommation temporelle mécanique a été largement utilisée dans l'étude de l'excitabilité de la moelle épinière lors de l'établissement du phénomène de *wind-up*. Ce phénomène est caractérisé par l'augmentation des décharges de potentiel d'action des neurones de la corne dorsale suite à la répétition d'un stimulus d'intensité fixe de basse fréquence (Martin Guillot et al., 2014; Woolf, 1996). Les mécanismes entraînant le *wind-up* spinal interviennent de manière importante dans la chronicité associée à la sensibilisation centrale. Ainsi, le test sensoriel quantitatif dynamique de sommation temporelle permet de souligner la phase précoce du *wind-up*. Ce test nous donne en effet la possibilité d'évaluer la présence de mécanismes de sensibilisation centrale en incluant l'aspect de perception consciente de la douleur,

contrairement aux tests sensoriels statiques qui sont des évaluations réflexives de l'hypersensibilité (Martin Guillot et al., 2014).

Récemment, Guillot et *al.* (2014) ont développé un test sensoriel quantitatif chez le chat arthrosique où la sommation temporelle est générée par un appareil appliquant des stimuli mécaniques répétitifs. Alors que ces derniers auteurs étaient les premiers à évoquer le phénomène de sommation temporelle chez le chat conscient, ceux-ci ont déterminé qu'un certain nombre de répétitions de stimuli mécaniques de faible intensité (sous le seuil) pouvaient mener à la manifestation de comportements de douleur. En fait, ces réponses comportementales permettaient notamment de distinguer les chats appartenant au groupe arthrosique de ceux du groupe sain. En effet, la réponse évoquée par la sommation temporelle était amplifiée (plus rapide) chez les chats arthrosiques que chez les chats non arthrosiques, suggérant ainsi que la sensibilisation centrale jouerait un rôle dans la douleur chronique associée à l'arthrose chez le chat (Martin Guillot et al., 2014).

À notre connaissance, nous sommes les premiers à rapporter cette méthode d'évaluation de la réponse à la sommation temporelle dans un modèle rongeur d'arthrose. En effet, nous avons été en mesure de transposer chez le rat la méthode précédemment développée par Guillot et *al.* (2014) chez le chat. Avec quelques adaptations au protocole, un test sensoriel quantitatif dynamique de réponse à la sommation temporelle a été développé chez le rat. Intéressamment, le groupe OA démontrait une certaine tendance vers un seuil de stimulation (nombre de stimuli) plus faible, notamment aux 21^{ème} et 35^{ème} jours suivant l'intervention chirurgicale de CCLT-DMM. Ceci pourrait d'ailleurs suggérer que le phénomène de *wind-up* spinal survient possiblement chez le rat environ trois semaines après l'induction chirurgicale de la pathologie. En revanche, le fait que les résultats n'aient pas démontré de différences significatives pourrait possiblement être attribué à un manque de puissance statistique, soit une erreur de type II.

2.2. Analyses moléculaires

Toujours dans l'optique d'une meilleure caractérisation de la douleur dans les modèles animaux expérimentaux, le développement de méthodes de quantification de marqueurs physiologiques et biochimiques est un domaine d'étude bien en vogue depuis quelques années (Lotz et al., 2013). L'induction de douleurs inflammatoires et neuropathiques est associée à une

activité moléculaire marquée au niveau de la moelle épinière, qui inclue notamment des modifications dans la signalisation intracellulaire. De ceci découlent ensuite des changements dans l'expression génique, ce qui entraîne d'emblée l'altération de la synthèse de macromolécules, de transmission synaptique et de l'architecture structurale. Ultimement, ces dérèglements supportent la sensibilisation centrale et par le fait même, l'établissement d'un état de douleur chronique (Geranton & Tochiki, 2015). Cette cascade, de mieux en mieux comprise, comporte plusieurs cibles intéressantes dans le développement de biomarqueurs. En effet, ces derniers pourraient potentiellement permettre une quantification de la progression de pathologies chroniques telles que l'arthrose, à un niveau structurel, fonctionnel et neuronal (Lotz et al., 2013; Malfait & Little, 2015). Dans l'étude présente, nous avons choisi d'analyser l'expression de neuropeptides et de micro-ARNs, soit des biomarqueurs potentiellement spécifiques aux phénomènes nociceptifs présents dans l'arthrose.

2.2.1. Analyse de neuropeptides spinaux

Alors que plusieurs médiateurs pronociceptifs sont libérés au niveau des tissus d'une articulation douloureuse, la sensibilisation des fibres axonales qui sont localisées à proximité entraîne des changements neurogènes jusque dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces changements affectent d'ailleurs la transmission et la modulation des signaux afférents. En effet, en réponse aux influx nociceptifs propagés aux terminaisons présynaptiques des fibres sensibles, les neuropeptides sont relâchés dans l'espace intersynaptique. Ces neuromodulateurs se trouvent alors à amplifier les influx nociceptifs afférents ou à inhiber les influx efférents provenant des neurones post-synaptiques. En temps normal, suite à l'intégration et à la modulation des informations nociceptives par les composantes du cerveau, les réponses de douleurs nociceptives renvoyées (descendantes) modulent les influx nociceptifs des fibres afférentes et des neurones de projection dans la corne dorsale de la moelle épinière. Par ailleurs, les messages retournés par le système nerveux central entraîneraient la relâche de sérotonine, de norépinéphrine et d'opioïdes endogènes, soit des inhibiteurs de la relâche de neuropeptides excitateurs au niveau périphérique. Cette analgésie (ou inhibition) descendante est souvent altérée (allant jusqu'à sa suppression) lors de syndromes de douleur chronique. Ultimement, l'hyperexcitabilité et l'absence de mécanismes d'inhibition des voies de nociception

(disinhibition) au niveau de la moelle épinière entraînent une boucle de rétroaction positive, correspondant au développement de la sensibilisation centrale.

Substance P et CGRP

Les neuropeptides SP et CGRP de la famille des tachykinines ont un rôle bien décrit dans l'établissement et la maintenance de la sensibilisation périphérique et centrale dans l'arthrose (Otis et al., 2016; Zubrzycka & Janecka, 2000). Au niveau périphérique, la SP et le CGRP contribuent à la mise en place de l'œdème articulaire en favorisant l'épanchement de plasma et la dilatation des vaisseaux sanguins (inflammation neurogénique). De plus, la SP intervient dans l'amplification de l'activité des nocicepteurs en favorisant la dégranulation des mastocytes et la relâche d'histamine (Lorenz et al., 2011). Évidemment, ces effets contribuent non seulement à la sensibilisation périphérique, mais éventuellement aussi à la sensibilisation centrale. En effet, le CGRP par ses multiples interactions avec plusieurs autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs est connu comme ayant un rôle important dans la mise en place initiale de mécanismes de nociception au niveau spinal (Ferland, Pailleux, et al., 2011). D'ailleurs, le CGRP amplifierait la relâche au niveau central de la SP à partir des fibres afférentes primaires (Ferland, Pailleux, et al., 2011; Oku et al., 1987). Considérée comme étant le neuropeptide excitateur clé du système somatosensoriel la SP est, pour sa part, reconnue pour son implication dans la mise en place de la neuro-inflammation et de la dérégulation des mécanismes neuroendocriniens et autonomes associés à la sensibilisation centrale (Gatenholm & Brittberg, 2018).

Dans l'étude actuelle, la concentration plus élevée de la SP et du CGRP le groupe OA comparativement au groupe naïf, concorde avec les études réalisées par Gervais et al. (2019), tant dans le modèle MIA que dans le modèle combo CCLT-DMM. Néanmoins, contrairement aux résultats concernant le modèle combo de cette étude préliminaire, seule la SP était significativement augmentée au 56^{ème} jour suivant la chirurgie, en ce qui concerne l'étude présente. Ceci est intéressant considérant que dans l'étude de Gervais et al. (2019), l'analyse de neuropeptidomique était réalisée sur les moelles épinières récupérées au 42^{ème} jour suivant la chirurgie soit, deux semaines plus tôt (Gervais et al., 2019). En effet, ceci correspond à l'influence qu'aurait le CGRP sur l'activité de la SP, qui serait d'ailleurs associée plus fortement

que le CGRP dans la maintenance de la douleur associée à l'arthrose (Ferland, Pailleux, et al., 2011). L'hypersensibilité observée dans le groupe de rongeurs OA par les évaluations fonctionnelles aurait ainsi possiblement été mise en place par le CGRP de manière plus importante de prime abord. Par la suite, une certaine persistance de la sensibilisation pourrait avoir été maintenue par la SP, due à l'amplification des signaux nociceptifs et de la réponse à la douleur au niveau central (Zubrzycka & Janecka, 2000).

Bradykinine

La BK est un neuromodulateur périphérique et central de la famille des kinines. Alors qu'elle est principalement connue comme étant un médiateur inflammatoire périphérique possédant un rôle majeur dans la sensibilisation à ce niveau, celle-ci intervient également dans la transmission centrale de la douleur (Ferreira et al., 2002; Wang et al., 2005). L'activité augmentée de la BK dans la moelle épinière lors de pathologies articulaires proviendrait initialement de sa relâche importante au niveau des tissus périphériques endommagés (Kandel et al., 2013). Ainsi, en circonstance inflammatoire, la BK active les fibres nociceptives afférentes à partir de la périphérie et ces fibres amplifieraient subséquemment sa relâche au niveau spinal (Kohno et al., 2008; Wang et al., 2005). Dans le système nerveux central, la régulation à la hausse de ce neuropeptide contribuerait aux phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie observés et ce, en améliorant l'efficacité de la transmission des signaux nociceptifs à la corne dorsale de la moelle épinière par l'amplification de l'activité des récepteurs au glutamate NMDA et AMPA (Kohno et al., 2008; Wang et al., 2005).

Certaines études, incluant celle de Gervais et *al* (2019), ont déjà noté une augmentation significative de la BK, au même titre que la SP et le CGRP, chez les rats dont l'arthrose avait été induite chirurgicalement (modèle MIA) (Gervais et al., 2019; Meini & Maggi, 2008; Otis et al., 2017; Otis et al., 2019). Néanmoins, dans leur étude pilote, Gervais et *al*. n'avaient pas été en mesure de démontrer une augmentation significative de la BK au jour 42 de l'étude, une observation attribuée selon les auteurs à un manque de puissance statistique (Gervais et al., 2019). Par ailleurs, dans l'étude de Bouet et *al*. (2019), où l'effet de l'exercice sur le modèle CCLT-DMM était étudié, le groupe OA sans exercice ne présentait pas d'augmentation significative de la BK au 56^{ème} jour, alors que celle-ci l'était pour le groupe OA avec exercice.

De manière intéressante, alors que tous les sujets de l'étude actuelle étaient soumis à un protocole d'exercice modéré, les rats OA exprimaient également le neuropeptide à un niveau significativement plus grand que les rats naïfs. Ceci corrobore d'ailleurs l'implication bien décrite de la BK dans les mécanismes inflammatoires. En effet, l'exercice modéré surenchérait les dommages structuraux articulaires importants dans le modèle chirurgical CCLT-DMM (Bouet et al., 2019). Par le fait même, ceci contribuerait à une inflammation possiblement plus marquée dans l'articulation du genou, qui se rapprocherait davantage à l'inflammation importante et temporaire du modèle MIA (Gervais et al., 2019).

Somatostatine

À l'opposé de la SP, la STT est considérée comme étant l'un des neuropeptides clés dans l'inhibition du système somatosensoriel (Gatenholm & Brittberg, 2018). En effet, en condition de douleur inflammatoire, la STT interagit avec plusieurs neurotransmetteurs excitateurs, incluant le glutamate, la SP et le CGRP, pour agir en tant qu'anti-inflammatoire et antidouleur (Pinter et al., 2006; Sten Shi et al., 2014). Mais également, la présence de STT dans des interneurons excitateurs et de récepteurs SST_{2a} dans les neurones GABAergiques inhibiteurs, laisse à penser que la libération de STT par les premiers génèrerait une désinhibition qui participe dans la réduction de neurotransmission GABAergique inhibitrice, et donc dans la sensibilisation centrale. La régulation à la hausse de la STT a d'ailleurs été observée dans divers modèles de conditions de douleur arthrosique (MIA et chirurgicaux). Cette observation a d'ailleurs permis de décrire ce neuropeptide comme étant un indicateur pertinent témoignant de la mise en place de processus menant à la sensibilisation nociceptive (Gervais et al., 2019).

Dans la présente étude, l'augmentation de l'expression de la STT mesurée dans la moelle épinière des rats OA comparativement aux rats naïfs n'était cependant pas significative ($P = 0.065$). Il est néanmoins difficile d'expliquer avec certitude ce résultat, car plusieurs hypothèses sont plausibles. D'abord, un manque de puissance statistique impliquant une erreur de type II pourrait être en cause ici. En effet, si l'on considère que la STT était augmentée chez le groupe OA, ceci corrèlerait avec les observations d'études antérieures (Gervais et al., 2019; Otis et al., 2017). Ces dernières suggèrent notamment une association entre la concentration spinale de STT et la sévérité des lésions au cartilage induites par différentes doses de MIA (Otis et al.,

2017) ou encore, selon différents modèles d'induction d'arthrose chirurgicaux (Gervais et al., 2019). De plus, la régulation à la hausse de la STT a été décrite comme étant indicatrice d'une potentielle induction d'allodynie en conditions inflammatoires (Gervais et al., 2019), confirmant les conclusions tirées des analyses fonctionnelles de la douleur et des autres neuropeptides mesurés. Dans un autre ordre d'idées, le résultat mitigé de la différence d'expression de la STT entre les deux groupes reflète en quelque sorte la différence moins marquée qu'attendu à la fin de l'étude en ce qui a trait aux évaluations fonctionnelles de la douleur. En effet, tant l'index d'asymétrie calculé pour le SWB que celui calculé pour le QST statique, ont démontré un retour aux valeurs initiales (*baseline*) pour le groupe OA aux 49^{ème} et 56^{ème} jours suivant la chirurgie. La même tendance peut d'autant plus être observée en ce qui concerne l'évolution temporelle des résultats de RMTS. Ainsi, il est possible d'évoquer l'hypothèse que vers le 49^{ème} jour post-chirurgie, les processus nociceptifs se retrouvent sous un certain contrôle au niveau du système nerveux central.

2.2.2. Analyse de micro-ARNs spinaux

Les miARNs sont de petites molécules intervenant notamment dans la régulation de la traduction, auxquelles l'on s'intéresse de plus en plus dans plusieurs sphères de la recherche en santé. En effet, dans les dernières années, diverses études ont ciblé ces petits ARNs comme étant en cause dans le développement de différentes conditions pathologiques (Lutz et al., 2014). Ainsi, l'importance donnée aux miARNs est notable tant au niveau du développement de méthodes diagnostiques, pronostiques, que thérapeutiques (Tramullas et al., 2018). Concernant le projet actuel, l'objectif visait en premier lieu à améliorer notre compréhension de la pathogenèse de l'arthrose. Ainsi, les nombreuses études associant l'expression aberrante de miARNs à certaines pathologies de douleur chronique chez l'humain nous ont poussés à explorer ces changements d'expression de miARNs dans notre modèle rongeur d'arthrose et ce, afin d'établir des liens entre la neuro-épigénétique et les conséquences fonctionnelles, structurelles et neuropeptidomiques relatées par certaines études antérieures (Gervais et al., 2019; Otis et al., 2016; Otis et al., 2017; Otis et al., 2019). Puisque cette étude est la première à mesurer l'expression de miARNs dans le modèle chirurgical CCLT-DMM avec exercice régulier, la quantification a été réalisée au niveau de la moelle épinière, car il s'agit d'un point critique dans la mise en place de la sensibilisation nociceptive. Éventuellement, d'autres

analyses pourraient s'étendre aux fluides corporels, tels que le sérum qui permet notamment un prélèvement moins invasif.

La sélection des miARNs ciblés pour ce projet, était basée sur une revue de littérature principalement inspirée de recherches cliniques réalisées chez l'humain afin d'identifier des miARNs potentiellement associés à l'arthrose (Andersen et al., 2014; Bali & Kuner, 2014; Beyer et al., 2015; Li et al., 2016; Miyaki et al., 2009; Murata et al., 2010; Niederberger et al., 2011; Park et al., 2013; Taganov et al., 2006). Ensuite, d'autres études caractérisant ceux-ci plus en détails dans divers modèles de douleurs inflammatoires et neuropathiques ont été consultées (Aldrich et al., 2009; Bhalala et al., 2012; Kusuda et al., 2011; Kynast, Russe, Moser, et al., 2013; Li et al., 2011; Li et al., 2013; Lin et al., 2014; Liu et al., 2009; Nakanishi et al., 2010; Pan et al., 2014; Sakai et al., 2013; Sakai & Suzuki, 2013; Song et al., 2013; von Schack et al., 2011; Yu et al., 2011). Dès lors, quatorze miARNs ont été étudiés dans l'optique de générer un profil d'expression différentielle de miARNs entre les groupes de rats OA et naïfs. Cela visait à refléter les résultats des autres analyses de l'étude ayant préalablement démontré une bonne validité dans ce modèle expérimental. L'objectif de l'étude a ainsi été partiellement atteint, alors que les différences entre les groupes étaient globalement moins marquées qu'attendu pour la plupart des analyses réalisées. Enfin, l'étude des miARNs a effectivement démontré une certaine corrélation avec ces résultats, alors qu'un seul miARN a démontré une expression spinale significativement augmentée dans le groupe OA par rapport au groupe naïf. Néanmoins, le miARN en question, soit miR-181b, reste très pertinent dans l'étude de l'arthrose, de par son implication potentielle à plusieurs niveaux dans la pathologie.

MiR-181b

MiR-181b fait partie d'une famille de miARNs spécifique aux vertébrés qui inclut six homologues (Yang et al., 2014). Les cibles prédites sont généralement les mêmes pour les membres d'une même famille de miARN, alors que ceux-ci partagent la même séquence entre les nucléotides 2-8. Les différences retrouvées dans le reste de la séquence confèrent ainsi l'identité spécifique à chacun des membres d'une même famille. Ce faisant, l'affinité de chacun à se lier aux cibles prédites varie plus ou moins fortement (D.P. Bartel, 2009). La famille miR-181 a été décrite comme ayant des rôles majeurs dans la régulation de plusieurs processus

biologiques. L'analyse des gènes ciblés par ces miARNs a notamment permis de souligner leur implication au niveau des mécanismes de liaison à l'ADN, de régulation de la transcription et de la traduction. Ainsi, il a été suggéré que cette famille pourrait être fortement associée avec les processus de division et différenciation cellulaires, l'ontogénie et le développement du système nerveux, ainsi que du système immunitaire (Yang et al., 2014). De plus, dans les dernières années, plusieurs études ont démontré que les membres de la famille miR-181 auraient des rôles dans le cancer ainsi que d'autres maladies associées, notamment des conditions de douleur chronique (Elramah, Landry, & Favereaux, 2014; Hutchison et al., 2013; Wu, Zhou, & Zou, 2017; Yang et al., 2014). D'ailleurs, les membres miR-181a et miR-181b sont maintenant identifiés comme étant impliqués dans plusieurs processus liés à l'arthrose, dont la destruction des tissus articulaires, l'inflammation et la sensibilisation nociceptive (Nakamura et al., 2019; Nakamura et al., 2016; Song et al., 2013; Wu et al., 2017).

L'implication des miR-181 au niveau structurel est particulièrement d'intérêt en ce qui concerne la régulation des chondrocytes puisque ces miARNs sont décrits comme étant des inhibiteurs de la prolifération et des promoteurs de l'apoptose de ces cellules (Wu et al., 2017). Certaines études ont en effet pu démontrer que miR-181a et miR-181b pouvait entraîner une régulation à la hausse de l'expression de MMPs, dont MMP-13 (Nakamura et al., 2019; Nakamura et al., 2016), MMP-2 et MMP-9 (Wu et al., 2017), soit des enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse des articulations. Par ailleurs, une régulation à la baisse de la protéine COL2A1, connue pour son rôle majeur au niveau de la matrice cartilagineuse, est observée (Nakamura et al., 2016). Du coup, ces informations sont pertinentes sachant que l'activité de dégradation protéolytique du cartilage articulaire est l'une des signatures principales de l'arthrose. De plus, ces miARNs interagissent avec des médiateurs de voies apoptotiques, tels que la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) p85 (Nakamura et al., 2016; Wu et al., 2017), ainsi qu'avec des facteurs inflammatoires, cytokines et chimiokines (TNF α , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1)) (Nakamura et al., 2016). Chez le patient arthrosique, il a été établi que l'atteinte structurelle et les changements moléculaires qui surviennent au niveau du cartilage mènent ultimement à un déséquilibre de l'homéostasie de l'ensemble des structures articulaires (Kuyinu et al., 2016). D'ailleurs, ces changements pathologiques survenant au niveau de l'articulation favorisent notamment la mise en place d'une

sensibilisation périphérique et éventuellement centrale (Fusco et al., 2017; Mease et al., 2011; Noh et al., 2018).

D'ailleurs, la famille miR-181 interviendrait possiblement dans l'atteinte fonctionnelle associée à la douleur arthrosique. En effet, certaines études témoignent d'une activité amplifiée des voies nociceptives en réponse à une expression altérée de miR-181 (Elramah et al., 2014). Le système GABAergique serait d'ailleurs ciblé par ce miARN, alors qu'une surexpression de miR-181 au niveau spinal régulerait à la baisse le principal système inhibiteur au niveau central. Cela entraînerait potentiellement une facilitation de la transmission des signaux de douleur (Nakamura et al., 2016; Song et al., 2013). L'association de miR-181 à la régulation des récepteurs GABA aurait d'abord été mise de l'avant par une étude utilisant la bioinformatique pour prédire les miARNs qui ciblerait ces récepteurs. Ensuite, certains ont été vérifiés expérimentalement par la validation de l'expression de gènes rapporteurs de la séquence 3'UTR (essai 3'UTR-reporter) (Zhao et al., 2012). Parmi ceux-ci, miR-181, miR-23 et miR-216 ont pu être identifiés et associés à la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur GABA. Ceci est potentiellement d'intérêt dans l'étude de la douleur chronique, alors que plus de 95% des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sont en fait des interneurons impliqués dans le traitement des informations nociceptives. Ces mêmes structures sont aussi impliquées dans la définition du niveau d'excitabilité de la corne dorsale, notamment par la relâche de diverses substances neuromodulatrices, dont le GABA (Graham, Brichta, & Callister, 2007; Purves et al., 2015b). Environ 30% de ces interneurons seraient associés aux voies inhibitrices descendantes et relâcheraient par le fait même du GABA (Graham et al., 2007; Purves et al., 2015b). Dans une étude subséquente, miR-181 a pu être associé à la douleur inflammatoire chronique par son interaction avec le système GABAergique. L'étude était réalisée sur un modèle de cystite néonatale chez le rat induite par l'injection intravésiculaire de zymosan, un agent d'inflammation local. De manière intéressante, cette étude a démontré que la condition inflammatoire entraînait une surexpression de miR-181a et miR-181b dans la moelle épinière chez les rats présentant une hypersensibilité viscérale due à la condition inflammatoire. Aussi, cette activité plus marquée de miR-181 induisait potentiellement une régulation à la baisse du transcrit et de l'expression de la protéine de la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur GABA dans la région lombo-sacrée de la moelle épinière (Sengupta et al., 2013).

Du coup, les résultats obtenus à partir des analyses neuropeptidomiques et neuro-épigénétiques permettent de poser l'hypothèse d'une atteinte dans la neuromodulation de la balance inhibition/facilitation nociceptive au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, notamment en ce qui concerne la régulation du système GABAergique. Évidemment, plusieurs notions restent à être élucidées, mais les résultats de l'étude actuelle ont permis d'identifier plus précisément certaines orientations à prendre dans le futur. D'ailleurs, les résultats mitigés concernant la STT prennent une certaine importance si l'on considère que ce neuropeptide et le miR-181 sont tous deux associés au système GABAergique. En effet, certaines études ont démontré que l'augmentation de la STT survenant au cours de processus nociceptifs entraînait une levée de la désinhibition GABAergique, *via* l'internalisation des récepteurs de la STT ou la fixation de STT sur ses récepteurs SST_{2a} dont l'activation au niveau des neurones GABAergiques est inhibitrice, permettant au final une certaine désinhibition des signaux de douleur (Gervais et al., 2019; Otis et al., 2017; Sten Shi et al., 2014). Cependant, dans l'étude présente, les valeurs de STT suggéraient plutôt un retour vers un niveau d'expression normal et donc une action potentiellement pronociceptive du neuropeptide. Fait intéressant, la surexpression du miR-181b reflète d'autant plus l'inhibition du système GABAergique, ce qui expliquerait peut-être en partie le phénomène de facilitation des signaux nociceptifs survenant dans l'arthrose.

Enfin, les miARNs semblent être des biomarqueurs prometteurs ayant le pouvoir de mettre en évidence les failles dans les mécanismes nociceptifs à différents niveaux (transmission, modulation, perception, *etc.*). Alors qu'ils ont un effet sur le niveau d'expression de protéines et peptides en agissant directement sur les transcrits d'ARNm, ces petites molécules possèdent un potentiel important dans l'amélioration de notre compréhension de la douleur chronique et pourrait éventuellement contribuer au développement de nouveaux analgésiques.

2.3. Analyses macroscopiques et histologiques

Bien que le modèle d'induction de l'arthrose utilisé dans l'étude présente ait démontré une capacité intéressante à entraîner des changements neurophysiologiques quantifiables et compatibles avec la douleur chronique lorsque réalisé pour la première fois chez le rat dans l'étude pilote de Gervais et *al.*, l'effet au niveau structurel de l'articulation n'avait pas été

analysé (Gervais et al., 2019). Subséquemment, Bouet et al. (2019), qui ont repris ce même modèle pour évaluer l'effet d'un protocole d'exercice modéré, ont pu démontrer en histologie que chez des individus sédentaires le modèle combo CCLT-DMM induisait de manière significative l'apoptose/nécrose des chondrocytes et des lésions au cartilage. Conséquemment, ceci aurait entraîné une altération des composantes de la matrice extracellulaire et une perte de protéoglycanes. Cependant, seul un faible niveau de formation d'amas de cellules de cartilage était noté chez ces sujets, indiquant un stade relativement précoce de la progression de l'arthrose. De manière intéressante, chez les individus ayant subi la chirurgie CCLT-DMM et qui étaient soumis au même protocole d'exercice que celui de l'étude présente, les dommages structuraux articulaires étaient plus prononcés, alors que les lésions au cartilage, la perte de protéoglycanes et la formation d'amas cellulaire se sont avérés significativement plus prononcées (Bouet et al., 2019).

Ainsi dans l'étude actuelle, des dommages importants étaient attendus à l'évaluation histologique. Afin de mieux caractériser l'effet du modèle au niveau structurel, une analyse macroscopique des tissus articulaires était initialement réalisée. Les résultats obtenus sont d'ailleurs particulièrement intéressants, allant de concert avec ce qui avait été observé par Bouet et al. (2019). Alors que les résultats des analyses fonctionnelles de la douleur et moléculaires portaient à croire que la chirurgie CCLT-DMM combinée à un protocole d'exercice modéré, avait seulement induit l'établissement de mécanismes modestes de douleur arthrosique, les résultats de macroscopie et d'histologie ont démontré que l'articulation du genou atteinte présentait des lésions sévères chez les rats OA. Au niveau macroscopique du cartilage hyalin notamment, près de 20% de la structure présentait un niveau d'irrégularité et d'érosion significatif chez les individus OA (Lotz et al., 2010). Par l'histologie, il a été possible de déterminer que l'homéostasie du cartilage était débalancée suite à la présence importante de formation d'amas cellulaire. De plus, tel que noté, la perte significative de protéoglycanes et de chondrocytes entraîne généralement des modifications au niveau des composantes articulaires associées à l'activation de processus nociceptifs liés à l'arthrose (Johnston, 1997; Xia et al., 2014). Néanmoins, bien que ces résultats témoignent de la réussite du modèle à induire des lésions articulaires compatibles avec l'arthrose, il importe de garder à l'esprit que l'atteinte structurelle est difficile à corrélérer avec l'intensité de la douleur dans l'arthrose (Fu et al., 2018;

Johnson & Hunter, 2014; Malfait & Little, 2015). Par ailleurs, le degré d'altération d'expression des miARNs ne pourrait expliquer le niveau de dégénération du cartilage observé chez les patients arthrosiques (Kung et al., 2017). Ainsi, davantage d'études analysant les aspects structurel et fonctionnel de la pathologie restent à être menées pour comprendre comment ceux-ci sont corrélés, notamment en ce qui concerne l'épigénétique.

3. Limites de l'étude

Cette étude préliminaire visait à explorer l'implication du phénomène de neuro-épigénétique dans un modèle d'arthrose chirurgical récemment développé. En effet, ce modèle a su démontrer un potentiel intéressant à reproduire des caractéristiques clés de la physiopathologie en induisant notamment des altérations fonctionnelles pouvant être mesurées, ainsi que des changements neuropeptidomiques quantifiables. La combinaison d'évaluations fonctionnelles et structurelles ainsi que d'analyses moléculaires au niveau spinal voulait notamment permettre une caractérisation complète de la douleur arthrosique associée à ce modèle. Cependant, bien qu'il soit démontré que des dommages à la moelle épinière sont présents dans l'arthrose, aucun biomarqueur spinal pouvant refléter de manière parfaitement représentative les dommages articulaires n'a été identifié à ce jour. Du coup, la neuropeptidomique reste une évaluation complémentaire aux autres évaluations, alors que la neuro-épigénétique pourrait potentiellement révéler de nouvelles informations au sujet de l'étiologie de la douleur arthrosique.

Malgré les diverses mesures mises en place visant à d'augmenter la validité et la reproductibilité des résultats (sexe des sujets et observateurs, environnement des animaux, protocole d'acclimatation, etc.), l'étude actuelle comporte certaines limitations à souligner, qui seront d'ailleurs importantes à prendre en compte lors d'éventuels travaux sur le sujet à réaliser avec ce modèle. D'abord, au cours de l'étude, les processus de sensibilisation centrale semblent avoir été d'une importance plus grande chez les rats OA entre les 21^{ème} et 35^{ème} jours suite à l'induction du modèle, selon ce que démontrent les analyses fonctionnelles. Par la suite, une certaine atténuation des processus nociceptifs semblait vouloir se manifester, alors qu'au moment du sacrifice des animaux (J56), un retour aux valeurs de normales pouvait s'observer sur plusieurs variables fonctionnelles. Cependant, ce retour vers la normale était d'autant plus

observable au niveau des analyses moléculaires de neuropeptidomique et d'épigénétique, alors que les changements présents entre les groupes étaient relativement peu marqués.

Plus particulièrement en ce qui concerne l'expression des miARNs, miR-181b est le seul ayant démontré une différence significative ($P < 0.05$) entre le groupe OA et le groupe sain. Par ailleurs, bien qu'il n'y aurait pas de seuil établi en ce qui concerne la variation d'expression (« *fold change* ») considérée comme biologiquement significative en ce qui concerne l'expression de miARNs, il est généralement considéré qu'un *fold change* ≤ 1.5 représente un résultat manquant de robustesse, alors que les résultats présentant un *fold change* plus marqué (i.e. > 2) sont normalement de plus grand intérêt (Li et al., 2013; Li et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Sengupta et al., 2013). Si l'on compare les résultats obtenus à partir de notre modèle chirurgical avec un modèle similaire, réalisé par Li et al. (2013), il est possible de constater que le *fold change* que nous avons obtenu pour l'expression différentielle de miR-181b est nettement moins important (1.26 vs > 2.00). Néanmoins, doit-on considérer que la méthode d'analyse n'était pas la même dans les deux études (Li et al., 2013). Dans l'étude de Li et al. (2016) l'expression de miARNs dans le liquide synovial était comparée entre des patients humains arthrosiques et des individus sains. L'analyse de l'expression des miARNs dans cette étude était réalisée par RT-qPCR telle que réalisée dans notre étude, et une fois de plus les *fold change* considérés comme étant valides étaient supérieurs à ce que nous avons obtenu (> 1.40) (Li et al., 2016).

Malgré tout, la différence d'expression obtenue pour miR-181b dans notre étude reste intéressante à considérer sachant que certains ajustements pourraient être apportés à notre protocole expérimental afin d'améliorer notre modèle, nos conditions expérimentales et nos méthodes de récoltes de données. En effet, une puissance statistique plus grande, une meilleure planification du déroulement de l'étude et la considération du protocole d'exercice pourraient permettre de corriger les problématiques rencontrées tant au niveau des analyses fonctionnelles de la douleur que des analyses moléculaires.

3.1. Puissance statistique

La puissance statistique d'un test correspond à la probabilité d'obtenir un résultat significatif (c'est-à-dire la probabilité de démontrer statistiquement l'hypothèse scientifique). En fait, cette probabilité est décrite par $1 - \beta$, où β correspond à l'erreur statistique de type II, soit

la probabilité de ne pas rejeter une hypothèse nulle alors que celle-ci est fautive. Par ailleurs, la puissance statistique est fonction de la taille de l'échantillon et de l'hypothèse concernant la véritable valeur de la différence entre les deux groupes (ou encore du « degré de fausseté » de l'hypothèse nulle). Lorsque l'on désire augmenter notre probabilité d'obtenir un résultat significatif, c'est le nombre d'individus à inclure dans l'étude qui est important à considérer, car la véritable valeur de la différence entre les deux groupes est inconnue. En effet, il est possible de calculer la taille d'échantillon en fonction de la différence hypothétique entre les deux groupes, et selon le degré de signification et de puissance désiré (Rousson, 2013).

En ce qui concerne l'étude actuelle, pour les évaluations fonctionnelles de la douleur, c'est 12 rats de chaque groupe qui étaient évalués, ce qui correspond notamment au nombre de sujets recommandés suite à l'étude pilote de Gervais et *al.* (2019). Les évaluations fonctionnelles de la douleur étaient d'autant plus réalisées en triplicata afin d'augmenter la validité des résultats. Or, pour l'évaluation de la réponse à la sommation temporelle mécanique, seul le premier résultat était considéré. En effet, il a été noté que la répétition de l'évaluation chez les rats sur une période de temps relativement courte entraînait un certain biais dans les résultats. Puisque cette évaluation était réalisée pour la première fois sur ce modèle, il était difficile de prévoir cette situation. Ainsi, dans les études futures utilisant cette évaluation, il serait recommandé de répéter la prise de mesure à différents moments dans la journée.

En ce qui a trait aux analyses moléculaires, les moelles épinières de six rats de chaque groupe étaient utilisées pour l'analyse de neuropeptidomique alors que celles des six autres rats du groupe étaient utilisées pour l'analyse de l'expression des miARNs. La puissance statistique était ainsi moindre pour les analyses moléculaires. D'ailleurs, l'erreur statistique de type II pourrait expliquer les différences relativement modestes observées entre les deux groupes étudiés.

3.2. Planification et durée de l'étude

Les modèles d'arthrose chirurgicaux sont préférés aux modèles chimiques lorsque l'on s'attarde à la progression de la maladie. En effet, les modèles chimiques, dont le modèle MIA, sont généralement critiqués en ce qui concerne leur capacité à reproduire adéquatement la pathogenèse (McDonald & Ajit, 2015). À l'inverse, le développement de processus arthrosiques

serait plus progressif et les changements seraient plus persistants avec les modèles chirurgicaux, comme le modèle CCLT-DMM (Mackey, Dixon, Johnson, & Kong, 2017), alors que les premiers signes d'hyperalgésie seraient généralement observés dans les quelques semaines suivant la chirurgie (Schaible, 2013).

Il est alors possible de poser l'hypothèse que l'expression des neuropeptides et des miARNs aurait été somme toute assez différente si les analyses avaient été réalisées plus tôt au cours de l'étude. Dans l'avenir, la quantification de ces biomarqueurs à plusieurs points dans le temps pourrait fournir des informations importantes sur l'évolution des processus moléculaires au cours du développement de l'arthrose. De plus, le suivi de l'évolution des biomarqueurs dans le temps permettrait une meilleure compréhension de notre modèle d'induction de l'arthrose. Évidemment, ceci implique qu'un plus grand nombre d'animaux serait nécessaire, requérant conséquemment plus de mains d'œuvre (observateurs, techniciens, *etc.*), et engendrant finalement des coûts supérieurs. Autrement, ceci contribue à justifier le besoin éventuel de développer une méthode d'analyse des miARNs moins invasive et plus simple, telle que l'analyse sanguine, qui reflèterait les changements d'expression en lien avec la douleur arthrosique.

3.3. Protocole d'exercice

L'une des critiques adressées à l'utilisation de modèles animaux vise la non-reproductibilité des données récoltées. L'une des causes identifiées qui contribueraient à cette problématique serait la sous-estimation de l'influence de facteurs associés au mode de vie des sujets étudiés. En effet, il est bien connu que les différentes habitudes de vie des patients arthrosiques contribuent de manière importante à la grande variabilité interindividuelle observée dans la présentation de la pathologie (Fu et al., 2018; Mogil, 2017). Parmi ces habitudes, le niveau d'activité physique module vraisemblablement la physiologie articulaire, tant chez le patient arthrosique que chez l'individu en santé. Or, l'impact de l'exercice sur la santé articulaire est un sujet complexe qui reste à être caractérisé davantage. Toutefois, il est bien établi que plusieurs facteurs, dont le type d'activité ainsi que l'intensité et la durée de l'activité, sont à considérer lors de la conduction d'études à ce sujet. En effet, ces différentes variables influencent la régulation et l'homéostasie du cartilage (Bricca, Juhl, Grodzinsky, & Roos, 2017).

Dans l'optique de créer un environnement se rapprochant davantage de la réalité des sujets cliniques, les rats de cette étude ont été soumis à un protocole d'exercice modéré. Il était notamment souhaité que ce protocole d'exercice réduise la variabilité des résultats d'analyses fonctionnelles de la douleur, comme démontré auparavant dans le modèle MIA (Otis et al., 2016). De plus, l'amplification et l'homogénéisation des lésions structurelles d'arthrose étaient attendues (Bouet et al., 2019). Bien que l'objectif de l'inclusion de ce protocole d'exercice allait de concert avec notre désir de conduire une étude avec une validité translationnelle supérieure, cet ajout au modèle a potentiellement eu un impact sur nos résultats d'analyse fonctionnelle de la douleur et d'analyse moléculaire. En effet, ces résultats démontraient des différences entre les groupes étudiés qui étaient considérablement moindres que ce qui était attendu. Néanmoins, les analyses de macroscopie et d'histologie démontrent une atteinte structurelle au niveau de l'articulation lésée significativement plus grande chez le groupe ayant subi la chirurgie. Dans l'étude récente de Bouet et al. (2019) qui visait à analyser l'influence d'un niveau d'exercice modéré sur le système somatosensoriel et sur l'atteinte du cartilage dans le modèle chirurgical CCLT-DMM d'arthrose chez le rat, il a été démontré qu'effectivement les altérations structurelles étaient amplifiées par l'exercice. Cependant, le confort des rats semblait également supérieur. Ainsi, il a été noté dans cette étude que les rats OA soumis à l'exercice utilisaient davantage leur membre affecté comparativement aux rats OA sédentaires. Il a donc été suggéré que l'exercice modéré menait à une altération structurelle de l'articulation plus marquée, mais à une réduction de la sensibilisation nociceptive et à une diminution de l'expression des neuropeptides associés à la douleur arthrosique (Bouet et al., 2019). Ainsi, l'observation d'une certaine résorption des processus nociceptifs dans l'étude actuelle, telle que perçue dans les analyses fonctionnelles de la douleur, la neuropeptidomique et possiblement la neuro-épigénétique, pourrait être attribuée en partie à la propriété anti-allodymique de l'exercice.

Section 5 : Conclusion

Les problématiques importantes associées à la complexité de la douleur chronique ouvrent la porte à une panoplie de possibilité d'avancement dans le domaine des études biomédicales. Parmi les multiples pathologies associées à la douleur chronique, l'arthrose en est une d'importance capitale. En effet, cette maladie articulaire dégénérative présente une prévalence marquée tant chez l'Homme que chez l'animal. Il s'agit d'une pathologie complexe, plus ou moins bien définie, qui regroupe plusieurs étiologies et facteurs de risque. Alors que la douleur en est la caractéristique principale, les dommages articulaires initiaux et l'inflammation périphérique qui s'ensuivent ne sont que le point de départ d'une cascade d'événements menant à des conséquences débilantes. De la sensibilisation nociceptive périphérique à la sensibilisation centrale, en passant par la neuroplasticité et l'inflammation neurogène, une multitude de mécanismes moléculaires sont impliqués dans la physiopathologie de cette maladie aux multiples facettes qui minent la qualité de vie des patients qui en souffrent.

Dans l'optique de mieux comprendre la pathologie de l'arthrose, la douleur chronique qui y est associée et éventuellement la traiter avec succès, l'usage de modèles expérimentaux animaux valides est essentiel. Une approche translationnelle dans un modèle d'arthrose rongeur combiné à l'emploi de méthodes d'évaluation fiables, valides et reproductibles ont permis la production d'une étude rigoureuse et complète. L'atteinte de nos objectifs a permis de confirmer notre hypothèse de départ suggérant que des marqueurs épigénétiques de l'arthrose pourraient être mis en évidence dans ce modèle d'arthrose chirurgicale chez le rat. En effet, comme prédit, les changements neuro-épigénétiques ont montré une concordance notable avec la littérature récente à ce sujet, notamment en ce qui concerne la neuropeptidomique et les évaluations fonctionnelles de la douleur. Or, tous ces changements se sont montrés moins prononcés qu'attendu, bien qu'ils reflétaient tout de même le développement d'une sensibilisation centrale à la nociception. L'interférence probable d'un protocole d'exercice avec la progression des processus nociceptifs pourrait avoir contribué à l'atténuation des différences entre les groupes de rats. Malgré tout, des lésions structurelles considérables et caractéristiques de l'arthrose étaient présentes.

Parmi les données notables, l'identification du miR-181b, soit le seul miARN ayant démontré une expression différentielle significative entre les rats sains et les rats arthrosiques, est certainement pertinente. Son expression régulée à la hausse dans la moelle épinière suite à l'émission de signaux nociceptifs combinée à la présence de conditions inflammatoires en périphérie sont en effet à considérer. De fait, la répression du système GABAergique, soit le principal inhibiteur de la nociception au niveau du système nerveux central, par la surexpression du miR-181b pourrait en partie expliquer la transmission des signaux de douleur facilitée chez les patients arthrosiques. Cette étude préliminaire adressant la neuro-épigénétique a donc permis de démontrer que la mise en place de la douleur chronique est fortement associée à l'altération des contrôles inhibiteurs descendants chez des rats dont l'arthrose a été induite chirurgicalement. En revanche, plusieurs ajustements seront nécessaires afin d'optimiser le potentiel de l'analyse neuro-épigénétique dans l'étude de la douleur chronique. Dans les études subséquentes, il serait notamment intéressant de suivre les changements neuro-épigénétiques et neuropeptidomiques à plusieurs moments au cours de l'évolution de la maladie. Enfin, cette étude a permis de souligner la pertinence de la neuro-épigénétique dans la quête d'une meilleure compréhension des processus associés à l'arthrose et dans l'amélioration de la recherche translationnelle.

Bibliographie

- (COFER), C. f. d. e. e. r. (2015). Chapitre 9 - Arthrose. In E. Masson (Ed.), *Rhumatologie* (5e ed., pp. 77-97). France.
- Akhtar, N., & Haqqi, T. M. (2012). MicroRNA-199a* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes. *Ann Rheum Dis*, *71*(6), 1073-1080. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200519
- Aldrich, B. T., Frakes, E. P., Kasuya, J., Hammond, D. L., & Kitamoto, T. (2009). Changes in expression of sensory organ-specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation. *Neuroscience*, *164*(2), 711-723. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.033
- Andersen, H. H., Duroux, M., & Gazerani, P. (2014). MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions. *Neurobiol Dis*, *71*, 159-168. doi:10.1016/j.nbd.2014.08.003
- Arendt-Nielsen, L. (2017). Pain sensitisation in osteoarthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *35*, 68-74.
- Arendt-Nielsen, L., Eskehave, T. N., Egsgaard, L. L., Petersen, K. K., Graven-Nielsen, T., Hoeck, H. C., . . . Bay-Jensen, A. C. (2014). Association between experimental pain biomarkers and serologic markers in patients with different degrees of painful knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*, *66*(12), 3317-3326. doi:10.1002/art.38856
- Arendt-Nielsen, L., Nie, H., Laursen, M. B., Laursen, B. S., Madeleine, P., Simonsen, O. H., & Graven-Nielsen, T. (2010). Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *Pain*, *149*(3), 573-581. doi:10.1016/j.pain.2010.04.003
- Arendt-Nielsen, L., Skou, S. T., Nielsen, T. A., & Petersen, K. K. (2015). Altered Central Sensitization and Pain Modulation in the CNS in Chronic Joint Pain. *Curr Osteoporos Rep*, *13*(4), 225-234. doi:10.1007/s11914-015-0276-x
- Aso, K., Shahtaheri, S. M., Hill, R., Wilson, D., McWilliams, D. F., & Walsh, D. A. (2019). Associations of Symptomatic Knee Osteoarthritis With Histopathologic Features in Subchondral Bone. *Arthritis Rheumatol*. doi:10.1002/art.40820
- Bai, G., Ambalavanar, R., Wei, D., & Dessem, D. (2007). Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain. *Mol Pain*, *3*, 15. doi:10.1186/1744-8069-3-15
- Bajaj, P., Bajaj, P., Graven-Nielsen, T., & Arendt-Nielsen, L. (2001). Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental controlled study. *Pain*, *93*, 107-114.
- Bali, K. K., & Kuner, R. (2014). Noncoding RNAs: key molecules in understanding and treating pain. *Trends Mol Med*, *20*(8), 437-448. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.006
- Bali, K. K., Selvaraj, D., Satagopam, V. P., Lu, J., Schneider, R., & Kuner, R. (2013). Genome-wide identification and functional analyses of microRNA signatures associated with cancer pain. *EMBO Mol Med*, *5*(11), 1740-1758. doi:10.1002/emmm.201302797
- Bao, L., Zhu, Y., Elhassan, A., Wu, Q., Xiao, B., Zhu, J., & Lindgren, J. (2001). Adjuvant-induced arthritis: IL-1 β , IL-6 and TNF-alpha are up-regulated in the spinal cord. *Neuroimmunology*, *12*(18), 3905-3908.

- Barone, R. (2000). Chapitre Premier: Caractères Généraux des Articulations, III. Articulations synoviales. In Vigot (Ed.), *Anatomie comparée des mammifères domestiques: Tome 2 Arthrologie et myologie* (4ème ed., pp. 13-24). Paris.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Barve, R. A., Minnerly, J. C., Weiss, D. J., Meyer, D. M., Aguiar, D. J., Sullivan, P. M., . . . Head, R. D. (2007). Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage*, *15*(10), 1190-1198. doi:10.1016/j.joca.2007.03.014
- Beale, B. S. (2005). Orthopedic problems in geriatric dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, *35*(3), 655-674. doi:10.1016/j.cvsm.2005.01.001
- Beaudry, F., Ferland, C. E., & 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*(9), 940-950. doi:10.1002/bmc.1206
- Bedson, J., & Croft, P. R. (2008). The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskeletal Disord*, *9*, 116. doi:10.1186/1471-2474-9-116
- Bee, L. A., & Dickenson, A. H. (2008). Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin. *Pain*, *140*(1), 209-223. doi:10.1016/j.pain.2008.08.008
- Bell, J. T., Loomis, A. K., Butcher, L. M., Gao, F., Zhang, B., Hyde, C. L., . . . Spector, T. D. (2014). Differential methylation of the TRPA1 promoter in pain sensitivity. *Nat Commun*, *5*, 2978. doi:10.1038/ncomms3978
- Beyer, C., Zampetaki, A., Lin, N. Y., Kleyer, A., Perricone, C., Iagnocco, A., . . . Kiechl, S. (2015). Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, *74*(3), e18. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204698
- Bhalala, O. G., Pan, L., Sahni, V., McGuire, T. L., Gruner, K., Tourtellotte, W. G., & Kessler, J. A. (2012). microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury. *J Neurosci*, *32*(50), 17935-17947. doi:10.1523/JNEUROSCI.3860-12.2012
- Bioseb. (2018). Kinetic Weight Bearing. Retrieved from https://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=1575.php [Référence consultée le 7 octobre 2018]
- Bonnet, C. S. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology*, *44*(1), 7-16. doi:10.1093/rheumatology/keh344
- Bouet, E., Otis, C., Cristofanilli, K. A., Labelle, E., Aoudj, D., Tardif, M., . . . E., T. (2019). Effect of exercise and analgesia on sensory sensitivity and structural alterations in a surgical rat model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*.
- Bove, S. E., Calcaterra, S. L., Brooker, R. M., Huber, C. M., Guzman, R. E., Juneau, P. L., . . . Kilgore, K. S. (2003). Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *11*(11), 821-830. doi:10.1016/s1063-4584(03)00163-8

- Bove, S. E., Laemont, K. D., Brooker, R. M., Osborn, M. N., Sanchez, B. M., Guzman, R. E., . . . Kilgore, K. S. (2006). Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage*, *14*(10), 1041-1048. doi:10.1016/j.joca.2006.05.001
- Boyce-Rustay, J. M., Zhong, C., Kohnken, R., Baker, S. J., Simler, G. H., Wensink, E. J., . . . Honore, P. (2010). Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology*, *58*(2), 537-543. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.08.008
- Bricca, A., Juhl, C. B., Grodzinsky, A. J., & Roos, E. M. (2017). Impact of a daily exercise dose on knee joint cartilage - a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in healthy animals. *Osteoarthritis Cartilage*, *25*(8), 1223-1237. doi:10.1016/j.joca.2017.03.009
- Briley, J. D., Williams, M. D., Freire, M., Griffith, E. H., & Lascelles, B. D. (2014). Feasibility and repeatability of cold and mechanical quantitative sensory testing in normal dogs. *Vet J*, *199*(2), 245-250. doi:10.1016/j.tvjl.2013.10.025
- Brown, D. C. (2017). What can we learn from osteoarthritis pain in companion animals? *Clinical and Experimental Rheumatology*, *35*(107), 53-58.
- Buchheit, T., Van de Ven, T., & Shaw, A. (2012). Epigenetics and the transition from acute to chronic pain. *Pain Med*, *13*(11), 1474-1490. doi:10.1111/j.1526-4637.2012.01488.x
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *7*(4), 147-154. doi:10.1016/s1672-0229(08)60044-3
- Chapman, V., & Dickenson, A. H. (1992). The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *European Journal of Pharmacology*, *219*, 427-433.
- Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L., & Im, H. J. (2017). Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res*, *5*, 16044. doi:10.1038/boneres.2016.44
- Chiu, I. M., von Hehn, C. A., & Woolf, C. J. (2012). Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci*, *15*(8), 1063-1067. doi:10.1038/nn.3144
- Clauw, D. J., & Hassett, A. L. (2017). The role of centralised pain in osteoarthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *35*, 79-84.
- Coulombe, M. A., Spooner, M. F., Gaumond, I., Carrier, J. C., & Marchand, S. (2011). Estrogen receptors beta and alpha have specific pro- and anti-nociceptive actions. *Neuroscience*, *184*, 172-182. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.057
- Creugny, A., Fender, A., & Pfeffer, S. (2018). Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Lett*. doi:10.1002/1873-3468.13067
- Crosio, C., Heitz, E., Allis, C. D., Borrelli, E., & Sassone-Corsi, P. (2003). Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J Cell Sci*, *116*(Pt 24), 4905-4914. doi:10.1242/jcs.00804
- Crow, M., Denk, F., & McMahon, S. B. (2013). Genes and epigenetic processes as prospective pain targets. *Genome Med*, *5*(2), 12. doi:10.1186/gm416

- de Lahunta, A., Glass, E., & Kent, M. (2015). Chapter 5 - Lower Motor Neuron : Spinal Nerve, General somatic Efferent System *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology* (4th ed., pp. 102-161). St. Louis, Missouri.
- Descalzi, G., Ikegami, D., Ushijima, T., Nestler, E. J., Zachariou, V., & Narita, M. (2015). Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends Neurosci*, *38*(4), 237-246. doi:10.1016/j.tins.2015.02.001
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*, *10*, 284. doi:10.3389/fnmol.2017.00284
- Dewey, C. W. (2016). Chapter 3 - Lesion Localization: Functional and Dysfunctional Neuroanatomy. In C. W. Dewey & R. C. da Costa (Eds.), *Practical Guide to Canine and Feline Neurology* (3rd ed., pp. 29-52). Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Domenech-Garcia, V., Palsson, T. S., Herrero, P., & Graven-Nielsen, T. (2016). Pressure-induced referred pain is expanded by persistent soreness. *Pain*, *157*(5), 1164-1172. doi:10.1097/j.pain.0000000000000497
- Dou, C., Zhang, C., Kang, F., Yang, X., Jiang, H., Bai, Y., . . . Dong, S. (2014). MiR-7b directly targets DC-STAMP causing suppression of NFATc1 and c-Fos signaling during osteoclast fusion and differentiation. *Biochim Biophys Acta*, *1839*(11), 1084-1096. doi:10.1016/j.bbagr.2014.08.002
- Eitner, A., Hofmann, G. O., & Schaible, H. G. (2017). Mechanisms of Osteoarthritic Pain. Studies in Humans and Experimental Models. *Front Mol Neurosci*, *10*, 349. doi:10.3389/fnmol.2017.00349
- Elramah, S., Landry, M., & Favereaux, A. (2014). MicroRNAs regulate neuronal plasticity and are involved in pain mechanisms. *Front Cell Neurosci*, *8*, 31. doi:10.3389/fncel.2014.00031
- Favereaux, A., Thoumine, O., Bouali-Benazzouz, R., Roques, V., Papon, M. A., Salam, S. A., . . . Landry, M. (2011). Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *EMBO J*, *30*(18), 3830-3841. doi:10.1038/emboj.2011.249
- Felson, D. T. (2009). Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, *11*(1), 203. doi:10.1186/ar2531
- Felson, D. T., Anderson, J. J., Naimark, A., Walker, A. M., & Meenan, R. F. (1988). Obesity and knee osteoarthritis. *Annals of Internal Medicine*, *109*(1), 18-24. doi:10.7326/0003-4819-109-1-18
- Ferland, C. E., Beaudry, F., & Vachon, P. (2012). Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. *Phytother Res*, *26*(9), 1278-1285. doi:10.1002/ptr.3725
- Ferland, C. E., Laverty, S., Beaudry, F., & Vachon, P. (2011). Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav*, *97*(3), 603-610. doi:10.1016/j.pbb.2010.11.003
- Ferland, C. E., Pailleux, F., Vachon, P., & Beaudry, F. (2011). Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides*, *45*(6), 423-429. doi:10.1016/j.npep.2011.07.007
- Ferreira, J., Campos, M. M., Araújo, R., Bader, M., Pesquero, J. B., & Calixto, J. B. (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(7), 1188-1197. doi:10.1016/s0028-3908(02)00311-8
- Ferrell, W. R., & Russell, N. J. W. (1986). Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fiber afferents of anaesthetized cat. *Journal of Physiology*, 379, 407-416.
- Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., & Riley, J. L., 3rd. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*, 10(5), 447-485. doi:10.1016/j.jpain.2008.12.001
- Fingleton, C., Smart, K., Moloney, N., Fullen, B. M., & Doody, C. (2015). Pain sensitization in people with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*, 23(7), 1043-1056. doi:10.1016/j.joca.2015.02.163
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1), 92-105. doi:10.1101/gr.082701.108
- Fu, K., Robbins, S. R., & McDougall, J. J. (2018). Osteoarthritis: the genesis of pain. *Rheumatology (Oxford)*, 57(suppl_4), iv43-iv50. doi:10.1093/rheumatology/kex419
- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., & Iba, H. (2008). miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 378(3), 492-504.
- Fürst, S. (1999). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 48(2), 129-141.
- Fusco, M., Skaper, S. D., Coaccioli, S., Varrassi, G., & Paladini, A. (2017). Degenerative Joint Diseases and Neuroinflammation. *Pain Pract*, 17(4), 522-532. doi:10.1111/papr.12551
- Gatenholm, B., & Brittberg, M. (2018). Neuropeptides: important regulators of joint homeostasis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 27(3), 942-949.
- Gaumond, I., Spooner, M. F., & Marchand, S. (2007). Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience*, 146(1), 366-374. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.002
- Geranton, S. M., & Tochiki, K. K. (2015). Regulation of gene expression and pain states by epigenetic mechanisms. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 131, 147-183. doi:10.1016/bs.pmbts.2014.11.012
- Gervais, J. A., Otis, C., Lussier, B., Guillot, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., . . . Troncy, E. (2019). Osteoarthritic pain model influences functional outcomes and spinal neuropeptidomics: A pilot study in female rats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 83, 133-141.
- Gerwin, N., Bendele, A. M., Glasson, S. S., & Carlson, C. S. (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 Suppl 3, S24-34. doi:10.1016/j.joca.2010.05.030
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376-387. doi:10.1016/s0140-6736(14)60802-3
- Gold, M. S., & Gebhart, G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*, 16(11), 1248-1257. doi:10.1038/nm.2235
- Golden, J. P., Hoshi, M., Nassar, M. A., Enomoto, H., Wood, J. N., Milbrandt, J., . . . Jain, S. (2010). RET signaling is required for survival and normal function of nonpeptidergic nociceptors. *J Neurosci*, 30(11), 3983-3994. doi:10.1523/JNEUROSCI.5930-09.2010

- Goldring, S. R. (2009). Role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Med Clin North Am*, 93(1), 25-35, xv. doi:10.1016/j.mcna.2008.09.006
- Graham, B. A., Brichta, A. M., & Callister, R. J. (2007). Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol*, 98(3), 1057-1063. doi:10.1152/jn.00581.2007
- Green, P. G., Basbaum, A. I., & Levine, J. D. (1992). Sensory neuropeptide interactions in the production of plasma extravasation in the rat. *Neuroscience*, 50(3), 745-749.
- Gregory, M. H., Capito, N., Kuroki, K., Stoker, A. M., Cook, J. L., & Sherman, S. L. (2012). A review of translational animal models for knee osteoarthritis. *Arthritis*, 2012, 764621. doi:10.1155/2012/764621
- Gregory, N. S., Harris, A. L., Robinson, C. R., Dougherty, P. M., Fuchs, P. N., & Sluka, K. A. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*, 14(11), 1255-1269. doi:10.1016/j.jpain.2013.06.008
- Griffioen, M. A., Dernetz, V. H., Yang, G. S., Griffith, K. A., Dorsey, S. G., & Renn, C. L. (2015). Evaluation of dynamic weight bearing for measuring nonevoked inflammatory hyperalgesia in mice. *Nurs Res*, 64(2), 81-87. doi:10.1097/NNR.0000000000000082
- Guenther, S., Reeh, P. W., & Kress, M. (1999). Rises in [Ca²⁺]_i mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *Eur J Neurosci*, 11, 3143-3150.
- Guillot, M. (2013). *Évaluation objective de la douleur chronique secondaire à l'arthrose chez le chat*. (Ph.D.), Université de Montréal.
- Guillot, M., Taylor, P. M., Rialland, P., Klinck, M. P., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., & Troncy, E. (2014). Evoked Temporal Summation in Cats to Highlight Central Sensitization Related to Osteoarthritis-Associated Chronic Pain: A Preliminary Study. *PLoS ONE*, 9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097347
- Hallberg, M. (2015). Neuropeptides: metabolism to bioactive fragments and the pharmacology of their receptors. *Med Res Rev*, 35(3), 464-519. doi:10.1002/med.21323
- Harvey, V. L., & Dickenson, A. H. (2009). Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain*, 5, 18. doi:10.1186/1744-8069-5-18
- Hill, C. L., Gale, D. G., Chaisson, C. E., Skinner, K., Kazis, L., Gale, M. E., & Felson, D. T. (2001). Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. *J Rheumatol*, 28, 1330-1337.
- Hui, A. Y., McCarty, W. J., Masuda, K., Firestein, G. S., & Sah, R. L. (2012). A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 4(1), 15-37. doi:10.1002/wsbm.157
- Hummel, M., & Whiteside, G. T. (2017). Measuring and realizing the translational significance of preclinical in vivo studies of painful osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 25(3), 376-384. doi:10.1016/j.joca.2016.08.007
- Hunter, D. J., McDougall, J. J., & Keefe, F. J. (2008). The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheum Dis Clin North Am*, 34(3), 623-643. doi:10.1016/j.rdc.2008.05.004
- Hunter, D. J., Schofield, D., & Callander, E. (2014). The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 10(7), 437-441. doi:10.1038/nrrheum.2014.44

- Hutchison, E. R., Kawamoto, E. M., Taub, D. D., Lal, A., Abdelmohsen, K., Zhang, Y., . . . Mattson, M. P. (2013). Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes. *Glia*, *61*(7), 1018-1028. doi:10.1002/glia.22483
- Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P., & Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE*, *3*(11), e3740. doi:10.1371/journal.pone.0003740
- Im, H. J., Li, X., Muddasani, P., Kim, G. H., Davis, F., Rangan, J., . . . Thonar, E. J. (2008). Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. *J Cell Physiol*, *215*(2), 452-463. doi:10.1002/jcp.21317
- International Association for the Study of Pain. (1979). The need of a taxonomy. *Pain*, *6*, 247-252.
- Johnson, V. L., & Hunter, D. J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, *28*(1), 5-15. doi:10.1016/j.berh.2014.01.004
- Johnston, S. A. (1997). Osteoarthritis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *27*(4), 699-723. doi:10.1016/s0195-5616(97)50076-3
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). Part III - Synaptic Transmission *Principles of Neural Science* (5th ed., pp. 177-330). United States of America: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kay, A., Richardson, J., & Forsyth, N. R. (2011). Physiological normoxia and chondrogenic potential of chondrocytes. *Frontiers in Bioscience*, *3*, 1365-1374.
- Klinck, M. P., Mogil, J. S., Moreau, M., Lascelles, B. D. X., Flecknell, P. A., Poitte, T., & Troncy, E. (2017). Translational pain assessment: could natural animal models be the missing link? *Pain*, *158*(9), 1633-1646. doi:10.1097/j.pain.0000000000000978
- Klinck, M. P., & Troncy, E. (2016). The physiology and pathophysiology of pain. In T. Duke-Novakowski, de Vries, M. & Seymour, C. (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia* (3 ed., pp. 97-112). Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association.
- Kohno, T., Wang, H., Amaya, F., Brenner, G. J., Cheng, J. K., Ji, R. R., & Woolf, C. J. (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*(17), 4533-4540. doi:10.1523/JNEUROSCI.5349-07.2008
- Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A., & Lohmander, L. S. (2015). Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage*, *23*(8), 1233-1241. doi:10.1016/j.joca.2015.03.036
- Krustev, E., Rioux, D., & McDougall, J. J. (2015). Mechanisms and Mediators That Drive Arthritis Pain. *Current Osteoporosis Reports*, *13*(4), 216-224. doi:10.1007/s11914-015-0275-y
- Kuner, R., & Flor, H. (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, *18*(1), 20-30. doi:10.1038/nrn.2016.162
- Kung, L. H. W., Zaki, S., Ravi, V., Rowley, L., Smith, M. M., Bell, K. M., . . . Little, C. B. (2017). Utility of circulating serum miRNAs as biomarkers of early cartilage degeneration in animal models of post-traumatic osteoarthritis and inflammatory arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, *25*, 426-434. doi:0.1016/j.joca.2016.09.002

- Kuraishi, Y., Hirota, N., Sato, Y., Kaneko, S., Satoh, M., & Takagi, H. (1985). Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn *Brain Research*, 359, 177-182.
- Kusuda, R., Cadetti, F., Ravanelli, M. I., Sousa, T. A., Zanon, S., De Lucca, F. L., & Lucas, G. (2011). Differential expression of microRNAs in mouse pain models. *Mol Pain*, 7, 17. doi:10.1186/1744-8069-7-17
- Kuyinu, E. L., Narayanan, G., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2016). Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*, 11, 19. doi:10.1186/s13018-016-0346-5
- Kynast, K. L., Russe, O. Q., Geisslinger, G., & Niederberger, E. (2013). Novel findings in pain processing pathways: implications for miRNAs as future therapeutic targets. *Expert Reviews*, 13(5), 515-525. doi:10.1586/ERN.13.34
- Kynast, K. L., Russe, O. Q., Moser, C. V., Geisslinger, G., & Niederberger, E. (2013). Modulation of central nervous system-specific microRNA-124a alters the inflammatory response in the formalin test in mice. *Pain*, 154(3), 368-376. doi:10.1016/j.pain.2012.11.010
- LaGraize, S. C., Borzan, J., Peng, Y. B., & Fuchs, P. N. (2006). Selective regulation of pain affect following activation of the opioid anterior cingulate cortex system. *Exp Neurol*, 197(1), 22-30. doi:10.1016/j.expneurol.2005.05.008
- Lahlou, H., Guillermet, J., Hortala, M., Vernejoul, F., Pyronnet, S., Bousquet, C., & Susini, C. (2004). Molecular Signaling of Somatostatin Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014(1), 121-131. doi:10.1196/annals.1294.012
- Lampropoulou-Adamidou, K., Lelovas, P., Karadimas, E. V., Liakou, C., Triantafillopoulos, I. K., Dontas, I., & Papaioannou, N. A. (2014). Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 24(3), 263-271. doi:10.1007/s00590-013-1205-2
- Lascelles, B. D. X., Brown, D. C., Maixner, W., & Mogil, J. S. (2018). Spontaneous painful disease in companion animals can facilitate the development of chronic pain therapies for humans. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(2), 175-183. doi:10.1016/j.joca.2017.11.011
- Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10(9), 895-926. doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012
- Lee, A. S., Ellman, M. B., Yan, D., Kroin, J. S., Cole, B. J., van Wijnen, A. J., & Im, H. J. (2013). A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*, 527(2), 440-447. doi:10.1016/j.gene.2013.05.069
- Leung, V., Zhang, E., & Pang, D. S. (2016). Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep*, 6, 31667. doi:10.1038/srep31667
- Levick, J. R. (1981). Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins. *Arthritis and Rheumatism*, 24(12), 1550-1560.
- Li, X., Gibson, G., Kim, J. S., Kroin, J., Xu, S., van Wijnen, A. J., & Im, H. J. (2011). MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene*, 480(1-2), 34-41. doi:10.1016/j.gene.2011.03.003
- Li, X., Kroin, J. S., Kc, R., Gibson, G., Chen, D., Corbett, G. T., . . . Im, H. J. (2013). Altered spinal microRNA-146a and the microRNA-183 cluster contribute to osteoarthritic pain in knee joints. *J Bone Miner Res*, 28(12), 2512-2522. doi:10.1002/jbmr.2002

- Li, Y. H., Tavallae, G., Tokar, T., Nakamura, A., Sundararajan, K., Weston, A., . . . Kapoor, M. (2016). Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, *24*(9), 1577-1586. doi:10.1016/j.joca.2016.04.019
- Ligon, C. O., Moloney, R. D., & 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*(1), 84-93. doi:10.1124/jpet.115.231670
- Lin, C. R., Chen, K. H., Yang, C. H., Huang, H. W., & Sheen-Chen, S. M. (2014). Intrathecal miR-183 delivery suppresses mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *Eur J Neurosci*, *39*(10), 1682-1689. doi:10.1111/ejn.12522
- Little, C. B., & Zaki, S. (2012). What constitutes an "animal model of osteoarthritis"--the need for consensus? *Osteoarthritis Cartilage*, *20*(4), 261-267. doi:10.1016/j.joca.2012.01.017
- Liu, B., Li, J., & Cairns, M. J. (2014). Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform*, *15*(1), 1-19. doi:10.1093/bib/bbs075
- Liu, N. K., Wang, X. F., Lu, Q. B., & Xu, X. M. (2009). Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Exp Neurol*, *219*(2), 424-429. doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.015
- Liu, X., Li, W., Dai, L., Zhang, T., Xia, W., Liu, H., . . . Jin, Y. (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*, 130-140. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.02.017
- Lorenz, M. D., Coates, J. R., & Kent, M. (2011). Part II - Clinical Problems: Signs and Symptoms, Chapter 14: Pain. In Elsevier (Ed.), *Handbook of veterinary neurology* (5th ed., pp. 413-431). St. Louis, Mo.: Saunders.
- Lotz, M., Martel-Pelletier, J., Christiansen, C., Brandi, M. L., Bruyere, O., Chapurlat, R., . . . Reginster, J. Y. (2013). Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis*, *72*(11), 1756-1763. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203726
- Lotz, M. K., Otsuki, S., Grogan, S. P., Sah, R., Terkeltaub, R., & D'Lima, D. (2010). Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum*, *62*(8), 2206-2218. doi:10.1002/art.27528
- Lutz, B. M., Bekker, A., & Tao, Y. X. (2014). Noncoding RNAs: new players in chronic pain. *Anesthesiology*, *121*(2), 409-417. doi:10.1097/ALN.0000000000000265
- Mackey, I. G., Dixon, E. A., Johnson, K., & Kong, J. T. (2017). Dynamic Quantitative Sensory Testing to Characterize Central Pain Processing. *J Vis Exp*(120). doi:10.3791/54452
- Malavolta, L., & Cabral, F. R. (2011). Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides*, *45*(5), 309-316. doi:10.1016/j.npep.2011.03.001
- Malda, J., Boere, J., van de Lest, C. H., van Weeren, P. R., & Wauben, M. H. (2016). Extracellular vesicles - new tool for joint repair and regeneration. *Nat Rev Rheumatol*, *12*(4), 243-249. doi:10.1038/nrrheum.2015.170
- Malfait, A. M. (2017). Why we should study pain in animal models of rheumatic diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *35*, 37-39.
- Malfait, A. M., & Little, C. B. (2015). On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, *17*, 225. doi:10.1186/s13075-015-0747-6

- Malfait, A. M., & Schnitzer, T. J. (2013). Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 9(11), 654-664. doi:10.1038/nrrheum.2013.138
- Massart, R., Dymov, S., Millecamps, M., Suderman, M., Gregoire, S., Koenigs, K., . . . Szyf, M. (2016). Overlapping signatures of chronic pain in the DNA methylation landscape of prefrontal cortex and peripheral T cells. *Sci Rep*, 6, 19615. doi:10.1038/srep19615
- McCoy, A. M. (2015). Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol*, 52(5), 803-818. doi:10.1177/0300985815588611
- McDonald, M. K., & Ajit, S. K. (2015). MicroRNA biology and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 131, 215-249. doi:10.1016/bs.pmbts.2014.11.015
- Mease, P. J., Hanna, S., Frakes, E. P., & Altman, R. D. (2011). Pain mechanisms in osteoarthritis: understanding the role of central pain and current approaches to its treatment. *J Rheumatol*, 38(8), 1546-1551. doi:10.3899/jrheum.100759
- Meini, S., & Maggi, C. A. (2008). Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflamm Res*, 57(8), 351-361. doi:10.1007/s00011-007-7204-1
- Melzack, R., & Casey, K. L. (1968). Sensory, motivational, and central control determinants of pain. In D. R. Kenshalo (Ed.), *The Skin Senses* (pp. 423-439). Springfield, IL: Thomas.
- Meriney, S. D., Gray, D. B., & Pilar, G. R. (1994). Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*, 369, 336-339.
- Miller, R. E., Block, J. A., & Malfait, A. M. (2017). Nerve growth factor blockade for the management of osteoarthritis pain: what can we learn from clinical trials and preclinical models? *Curr Opin Rheumatol*, 29(1), 110-118. doi:10.1097/BOR.0000000000000354
- Miller, T. R., Wetter, J. B., Jarvis, M. F., & Bitner, R. S. (2013). Spinal microglial activation in rat models of neuropathic and osteoarthritic pain: an autoradiographic study using [3H]PK11195. *Eur J Pain*, 17(5), 692-703. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00232.x
- Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S. P., Higashiyama, R., Inoue, A., . . . Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum*, 60(9), 2723-2730. doi:10.1002/art.24745
- Mogil, J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*, 13(12), 859-866. doi:10.1038/nrn3360
- Mogil, J. S. (2017). Laboratory environmental factors and pain behavior: the relevance of unknown unknowns to reproducibility and translation. *Lab Anim (NY)*, 46(4), 136-141. doi:10.1038/labani.1223
- Mogil, J. S., & Crager, S. E. (2004). What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain*, 112(1-2), 12-15. doi:10.1016/j.pain.2004.09.028
- Mogil, J. S., Davis, K. D., & Derbyshire, S. W. (2010). The necessity of animal models in pain research. *Pain*, 151(1), 12-17. doi:10.1016/j.pain.2010.07.015
- Möller, K. Ä., Johansson, B., & Berge, O.-G. (1998). Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Methods*, 84, 41-47.
- Moloney, V., & Kent, J. E. (1997). Assessment of acute pain in farm animals using behavioural and physiological measurements. *Journal of Animal Science*, 75, 266-272.
- Moreau, M., Pelletier, J. P., Lussier, B., d'Anjou, M. A., Blond, L., Pelletier, J. M., . . . Troncy, E. (2013). A posteriori comparison of natural and surgical destabilization models of canine osteoarthritis. *Biomed Res Int*, 2013, 180453. doi:10.1155/2013/180453

- Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., & Nakamura, T. (2010). Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, *12*(3), R86. doi:10.1186/ar3013
- Nakamura, A., Rampersaud, Y. R., Nakamura, S., Sharma, A., Zeng, F., Rossomacha, E., . . . Kapoor, M. (2019). microRNA-181a-5p antisense oligonucleotides attenuate osteoarthritis in facet and knee joints. *Ann Rheum Dis*, *78*(1), 111-121. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213629
- Nakamura, A., Rampersaud, Y. R., Sharma, A., Lewis, S. J., Wu, B., Datta, P., . . . Kapoor, M. (2016). Identification of microRNA-181a-5p and microRNA-4454 as mediators of facet cartilage degeneration. *JCI Insight*, *1*(12), e86820. doi:10.1172/jci.insight.86820
- Nakanishi, K., Nakasa, T., Tanaka, N., Ishikawa, M., Yamada, K., Yamasaki, K., . . . Ochi, M. (2010). Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal Cord*, *48*(3), 192-196. doi:10.1038/sc.2009.89
- Navarro, M., Ruberte, J., Carretero, M., & Lopez-Luppo, M. (2017). Arthrology. In A. Press (Ed.), *Morphological Mouse Phenotyping*: Elsevier.
- Neogi, T. (2013). The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *21*(9), 1145-1153. doi:10.1016/j.joca.2013.03.018
- Neogi, T. (2017). Structural correlates of pain in osteoarthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *35*, 75-78.
- Neogi, T., & Zhang, Y. (2013). Epidemiology of OA. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, *39*(1), 1-19. doi:10.1016/j.rdc.2012.10.004
- Niederberger, E., Kynast, K., Lotsch, J., & Geisslinger, G. (2011). MicroRNAs as new players in the pain game. *Pain*, *152*(7), 1455-1458. doi:10.1016/j.pain.2011.01.042
- Nieto, F. R., Clark, A. K., Grist, J., Chapman, V., & Malcangio, M. (2015). Calcitonin gene-related peptide-expressing sensory neurons and spinal microglial reactivity contribute to pain states in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol*, *67*(6), 1668-1677. doi:10.1002/art.39082
- Noh, K. C., Park, S. H., Yang, C. J., Lee, G. W., Kim, M. K., & Kang, Y. H. (2018). Involvement of synovial matrix degradation and angiogenesis in oxidative stress-exposed degenerative rotator cuff tears with osteoarthritis. *J Shoulder Elbow Surg*, *27*(1), 141-150. doi:10.1016/j.jse.2017.08.007
- O'Brien, M., Philpott, H. T., & McDougall, J. J. (2017). Understanding osteoarthritis pain through animal models. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *35*, 47-52.
- Ogston, A. G., & Stainer, J. E. (1953). The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *J. Physiol.*, *119*, 244-252.
- Oku, R., Satoh, M., Fujii, N., Otaka, A., Yajima, H., & Takagi, H. (1987). Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res*, *403*, 350-354.
- Olesen, A. E., Andresen, T., Staahl, C., & Drewes, A. M. (2012). Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacol Rev*, *64*(3), 722-779. doi:10.1124/pr.111.005447
- Orlova, I., Alexander, G. M., Qureshi, R., Sacan, A., Graziano, A., Barrett, J. E., . . . Ajit, S. K. (2011). MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome. *Journal of Translational Medicine*, *9*(195), 195.
- Otis, C., Gervais, J., Guillot, M., Gervais, J. A., Gauvin, D., Pethel, C., . . . Troncy, E. (2016). Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods

- in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. *Arthritis Res Ther*, *18*, 150. doi:10.1186/s13075-016-1047-5
- Otis, C., Guillot, M., Moreau, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Beaudry, F., & Troncy, E. (2017). Spinal neuropeptide modulation, functional assessment and cartilage lesions in a monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Neuropeptides*, *65*, 56-62. doi:10.1016/j.npep.2017.04.009
- Otis, C., Guillot, M., Moreau, M., Pelletier, J. P., Beaudry, F., & Troncy, E. (2019). Sensitivity of functional targeted neuropeptide evaluation in testing pregabalin analgesic efficacy in a rat model of osteoarthritis pain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Accepted for publication (CEPP-18-0539R1).
- Pan, Z., Zhu, L. J., Li, Y. Q., Hao, L. Y., Yin, C., Yang, J. X., . . . Cao, J. L. (2014). Epigenetic modification of spinal miR-219 expression regulates chronic inflammation pain by targeting CaMKIIgamma. *J Neurosci*, *34*(29), 9476-9483. doi:10.1523/JNEUROSCI.5346-13.2014
- Park, S. J., Cheon, E. J., & Kim, H. A. (2013). MicroRNA-558 regulates the expression of cyclooxygenase-2 and IL-1beta-induced catabolic effects in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, *21*(7), 981-989. doi:10.1016/j.joca.2013.04.012
- Pascual-Garrido, C., Guilak, F., Rai, M. F., Harris, M. D., Lopez, M. J., Todhunter, R. J., & Clohisy, J. C. (2017). Canine hip dysplasia: A natural animal model for human developmental dysplasia of the hip. *J Orthop Res*, 1807-1817. doi:10.1002/jor.23828
- Pasquini, C., Spurgeon, T., & Pasquini, S. (2007a). Joints. In T. Spurgeon (Ed.), *Anatomy of Domestic Animals* (11th ed., pp. 103-106). Pilot Point, Texas: Sudz Publishing.
- Pasquini, C., Spurgeon, T., & Pasquini, S. (2007b). Nervous system. In T. Spurgeon (Ed.), *Anatomy of Domestic Animals* (11th ed., pp. 443-528). Pilot Point, Texas: Sudz Publishing.
- Pethö, G., Derow, A., & Reeh, P. W. (2001). Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. *Eur J Neurosci*, *14*, 210-218.
- Piel, M. J., Kroin, J. S., van Wijnen, A. J., Kc, R., & Im, H. J. (2014). Pain assessment in animal models of osteoarthritis. *Gene*, *537*(2), 184-188. doi:10.1016/j.gene.2013.11.091
- Pinter, E., Helyes, Z., & Szolcsanyi, J. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther*, *112*(2), 440-456. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.010
- Prasoon, P., Kumar, R., Gautam, M., Sebastian, E. K., Reeta, K. H., & Ray, S. B. (2015). Role of somatostatin and somatostatin receptor type 2 in postincisional nociception in rats. *Neuropeptides*, *49*, 47-54. doi:10.1016/j.npep.2014.12.002
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., & White, L. E. (2015a). L'étude du système nerveux *Neurosciences* (5e ed., pp. 1-21). Louvain-la-Neuve: De Boeck.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., & White, L. E. (2015b). Partie 1: Les signaux nerveux *Neurosciences* (5e ed., pp. 25-185). Louvain-la-Neuve: De Boeck.
- Quadros, A. U., Pinto, L. G., Fonseca, M. M., Kusuda, R., Cunha, F. Q., & Cunha, T. M. (2015). Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Sci Rep*, *5*, 14648. doi:10.1038/srep14648

- Radin, E. L., Martin, R. B., Burr, D. B., Caterson, B., Boyd, R. D., & Goodwin, C. (1984). Effects of Mechanical Loading on the Tissues of the Rabbit Knee. *Journal of Orthopaedic Research*, 2, 221-234.
- Recchiuti, A., Krishnamoorthy, S., Fredman, G., Chiang, N., & Serhan, C. N. (2011). MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvins D1-miRNA circuits. *The FASEB Journal*, 25(2), 544-560.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*, 96, 414-495.
- Rousson, V. (2013). Principe d'un test statistique *Statistique appliquée aux sciences de la vie* (pp. 83-90). Paris Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Ruckebush, Y. (1991). Section IV - The Nervous System. In Y. Ruckebush, L. P. Phaneuf, & R. Dunlop (Eds.), *Physiology of small and large animals* (pp. 299-383). Philadelphia and Hamilton: B.C. Decker.
- Sagar, D. R., Burston, J. J., Hathway, G. J., Woodhams, S. G., Pearson, R. G., Bennett, A. J., . . . Chapman, V. (2011). The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. *Mol Pain*, 7, 88. doi:10.1186/1744-8069-7-88
- Sakai, A., Saitow, F., Miyake, N., Miyake, K., Shimada, T., & Suzuki, H. (2013). miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, 136(Pt 9), 2738-2750. doi:10.1093/brain/awt191
- Sakai, A., & Suzuki, H. (2013). Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 435(2), 176-181. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.089
- Sakai, A., & Suzuki, H. (2014). Emerging roles of microRNAs in chronic pain. *Neurochem Int*, 77, 58-67. doi:10.1016/j.neuint.2014.05.010
- Salaffi, F., Ciapetti, A., & Carotti, M. (2014). The sources of pain in osteoarthritis: a pathophysiological review. *Reumatismo*, 66(1), 57-71. doi:10.4081/reumatismo.2014.766
- Schaible, H. G. (2013). Joint pain-mechanisms. In McMahon (Ed.), *Wall and Melzack's Textbook of Pain* (6th ed., pp. 609-619). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Schaible, H. G., Ebersberger, A., & Von Banchet, G. S. (2002). Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 966, 343-354.
- Schött, E., Berge, O.-G., Ängeby-Möller, K., Hammarström, G., Dalsgaard, C. J., & Brodin, E. (1994). Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 31, 79-83.
- Schumacher, B. L., Block, J. A., Schmid, T. M., Aydelotte, M. B., & Kuettner, K. E. (1994). A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311(1), 144-152.
- Sengupta, J. N., Pochiraju, S., Kannampalli, P., Bruckert, M., Addya, S., Yadav, P., . . . Banerjee, B. (2013). MicroRNA-mediated GABA Aalpha-1 receptor subunit down-regulation in adult spinal cord following neonatal cystitis-induced chronic visceral pain in rats. *Pain*, 154(1), 59-70. doi:10.1016/j.pain.2012.09.002
- Shi, G., Shi, J., Liu, K., Liu, N., Wang, Y., Fu, Z., . . . Yuan, W. (2013). Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury. *Glia*, 61(4), 504-512.

- Singh, B. (2010). Part I - General Anatomy, Chapter 2 : The locomotor Apparatus. In K. M. Dyce, W. O. Sack, & C. J. G. Wensing (Eds.), *Textbook of Veterinary Anatomy* (4th ed., pp. 29-90). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier.
- Sjaastad, O. V., Sand, O., & Hove, K. (2010). Chapter 7: Bone Tissue and Mineral Metabolism *Physiology of domestic Animals* (2nd ed., pp. 259-278). Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Song, J., Lee, M., Kim, D., Han, J., Chun, C. H., & Jin, E. J. (2013). MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochem Biophys Res Commun*, *431*(2), 210-214. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.133
- Sorge, R. E., Martin, L. J., Isbester, K. A., Sotocinal, S. G., Rosen, S., Tuttle, A. H., . . . Mogil, J. S. (2014). Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*, *11*(6), 629-632. doi:10.1038/nmeth.2935
- Sten Shi, T.-J., Xiang, Q., Zhang, M.-D., Barde, S., Kai-Larsen, Y., Fried, K., . . . Hökfelt, T. (2014). Somatostatin and its 2A receptor in dorsal root ganglia and dorsal horn of mouse and human : expression, trafficking and possible role in pain. *Molecular Pain*, *10*(12).
- Sun, E., & Shi, Y. (2015). MicroRNAs: Small molecules with big roles in neurodevelopment and diseases. *Exp Neurol*, *268*, 46-53. doi:10.1016/j.expneurol.2014.08.005
- Swann, D. A., Slayter, H. S., & Silver, F. H. (1981). The molecular structure of Lubricating Glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, *256*(11), 5921-5925.
- Szolcsanyi, J., Helyes, Z., Oroszi, G., Németh, J., & Pinter, E. (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. *British Journal of Pharmacology*, *123*, 936-942.
- Szolcsanyi, J., Pinter, E., Helyes, Z., Oroszi, G., & Németh, J. (1998). Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *British Journal of Pharmacology*, *125*, 916-922.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(33), 12481-12486. doi:10.1073/pnas.0605298103
- Tao, Y., Wang, Z., Wang, L., Shi, J., Guo, X., Zhou, W., . . . Geng, D. (2017). Downregulation of miR-106b attenuates inflammatory responses and joint damage in collagen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, *56*(10), 1804-1813. doi:10.1093/rheumatology/kex233
- Tappe-Theodor, A., & Kuner, R. (2014). Studying ongoing and spontaneous pain in rodents--challenges and opportunities. *Eur J Neurosci*, *39*(11), 1881-1890. doi:10.1111/ejn.12643
- Tarafder, S., & Lee, C. H. (2016). Synovial Joint: In Situ Regeneration of Osteochondral and Fibrocartilaginous Tissues by Homing of Endogenous Cells. In A. Press (Ed.), *In Situ Regeneration*: Elsevier.
- Todd, A. J., Hughes, D. I., Polgár, E., Nagy, G. G., Mackie, M., Ottersen, O. P., & Maxwell, D. J. (2003). The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the

- dorsal horn. *European Journal of Neuroscience*, 17(1), 13-27. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02406.x
- Todd, A. J., Spike, R. C., & Polgar, E. (1998). A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, 85(2), 459-473.
- Tramullas, M., Francés, R., de la Fuente, R., Velategui, S., Carcelén, M., García, R., . . . Hurlé, M. A. (2018). MicroRNA-30c-5p modulates neuropathic pain in rodents. *Science Translational Medicine*, 10, 1-13.
- Tranquilli, W., Grimm, K. A., & Lamont, L. A. (2004). Section 1 - Pain Terminology, Physiology, Recognition, and Clinical Strategies for Management *Pain Management for the Small Animal Practitioner* (2nd ed., pp. 2-12). Jackson, WY: Teton NewMedia.
- van der Kam, E. L., Vry, J. D., Schiene, K., & Tzschentke, T. M. (2008). Differential effects of morphine on the affective and the sensory component of carrageenan-induced nociception in the rat. *Pain*, 136(3), 373-379. doi:10.1016/j.pain.2007.07.027
- van der Worp, H. B., Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O'Collins, V., & Macleod, M. R. (2010). Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med*, 7(3), e1000245. doi:10.1371/journal.pmed.1000245
- van Rooij, E. (2011). The art of microRNA research. *Circ Res*, 108(2), 219-234. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227496
- van Rooij, E., & Kauppinen, S. (2014). Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med*, 6(7), 851-864. doi:10.15252/emmm.201100899
- Vierck, C. J., Acosta-Rua, A., Nelligan, R., Tester, N., & Mauderli, A. (2002). Low dose systemic morphine attenuates operant escape but facilitates innate reflex responses to thermal stimulation. *The Journal of Pain*, 3(4), 309-319. doi:10.1054/jpai.2002.125186
- Vierck, C. J., Cannon, R., Fry, G., Maixner, W., & Whitsel, B. (1997). Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *Journal of Neurophysiology*, 78, 992-1002.
- Vierck, C. J., Hansson, P. T., & Yeziarski, R. P. (2008). Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain*, 135(1-2), 7-10. doi:10.1016/j.pain.2007.12.008
- von Schack, D., Agostino, M. J., Murray, B. S., Li, Y., Reddy, P. S., Chen, J., . . . Ajit, S. K. (2011). Dynamic changes in the microRNA expression profile reveal multiple regulatory mechanisms in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *PLoS ONE*, 6(3), e17670. doi:10.1371/journal.pone.0017670
- Wang, H., Kohno, T., Amaya, F., Brenner, G. J., Ito, N., Allchorne, A., . . . Woolf, C. J. (2005). Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci*, 25(35), 7986-7992. doi:10.1523/JNEUROSCI.2393-05.2005
- Warner, S. C., Walsh, D. A., Laslett, L. L., Maciewicz, R. A., Soni, A., Hart, D. J., . . . Valdes, A. M. (2017). Pain in knee osteoarthritis is associated with variation in the neurokinin 1/substance P receptor (TACR1) gene. *Eur J Pain*, 21(7), 1277-1284. doi:10.1002/ejp.1027
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2012). Chapitre 7: Structure du génome, chromatine et nucléosome *Biologie moléculaire du gène* (6ème ed., Vol. Pearson, pp. 109-154). Paris.

- Willemen, H., Huo, X.-J., Mao-Ying, Q.-L., Zijlstra, J., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2012). MicroRNA-124 as a novel treatment for persistent hyperalgesia. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(143).
- Wilson, H. D., Boyette-Davis, J., & Fuchs, P. N. (2007). The relationship between basal level of anxiety and the affective response to inflammation. *Physiol Behav*, *90*(2-3), 506-511. doi:10.1016/j.physbeh.2006.10.015
- Wodarski, R., Delaney, A., Ultenius, C., Morland, R., Andrews, N., Baastrup, C., . . . Rice, A. S. C. (2016). Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat. *Pain*, *157*(10), 2350-2365. doi:10.1097/j.pain.0000000000000657
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, *306*(5944), 686-688.
- Woolf, C. J. (1996). Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain*, *66*, 105-108.
- Wu, X. F., Zhou, Z. H., & Zou, J. (2017). MicroRNA-181 inhibits proliferation and promotes apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis by targeting PTEN. *Biochem Cell Biol*, *95*(3), 437-444. doi:10.1139/bcb-2016-0078
- Xia, B., Di, C., Zhang, J., Hu, S., Jin, H., & Tong, P. (2014). Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int*, *95*(6), 495-505. doi:10.1007/s00223-014-9917-9
- Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., . . . Ochi, M. (2009). Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum*, *60*(4), 1035-1041. doi:10.1002/art.24404
- Yang, Z., Wan, X., Gu, Z., Zhang, H., Yang, X., He, L., . . . Zhao, H. (2014). Evolution of the mir-181 microRNA family. *Comput Biol Med*, *52*, 82-87. doi:10.1016/j.combiomed.2014.06.004
- Yasaka, T., Tiong, S. Y., Hughes, D. I., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain*, *151*(2), 475-488. doi:10.1016/j.pain.2010.08.008
- Yu, B., Zhou, S., Wang, Y., Ding, G., Ding, F., & Gu, X. (2011). Profile of microRNAs following rat sciatic nerve injury by deep sequencing: implication for mechanisms of nerve regeneration. *PLoS ONE*, *6*(9), e24612. doi:10.1371/journal.pone.0024612
- Yu, C., Chen, W. P., & Wang, X. H. (2011). MicroRNA in Osteoarthritis. *The Journal of International Medical Research*(39), 1-9.
- Yu, X. M., Meng, H. Y., Yuan, X. L., Wang, Y., Guo, Q. Y., Peng, J., . . . Lu, S. B. (2015). MicroRNAs' Involvement in Osteoarthritis and the Prospects for Treatments. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2015*, 236179. doi:10.1155/2015/236179
- Zhang, X. J., Zhang, T. W., Hu, S. J., & Xu, H. (2011). Behavioral assessments of the aversive quality of pain in animals. *Neurosci Bull*, *27*(1), 61-67. doi:10.1007/s12264-011-1035-3
- Zhao, C., Huang, C., Weng, T., Xiao, X., Ma, H., & Liu, L. (2012). Computational prediction of MicroRNAs targeting GABA receptors and experimental verification of miR-181, miR-216 and miR-203 targets in GABA-A receptor. *BMC Res Notes*, *5*, 91. doi:10.1186/1756-0500-5-91
- Zhao, J., Lee, M. C., Momin, A., Cendan, C. M., Shepherd, S. T., Baker, M. D., . . . Wood, J. N. (2010). Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and

pain thresholds. *J Neurosci*, 30(32), 10860-10871. doi:10.1523/JNEUROSCI.1980-10.2010

Zubrzycka, M., & Janecka, A. (2000). Substance P: Transmitter of Nociception (minireview). *Endocrine Regulations*, 34, 195-201.