

Université de Montréal

**Caractérisation d'un modèle animal de douleur
articulaire associée à l'arthrose du genou chez le rat
Sprague-Dawley**

par

Catherine Estelle Ferland-Legault

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Philosophae Doctor (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

Juin, 2011

© Catherine E. Ferland, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée :

**Caractérisation d'un modèle animal de douleur articulaire
associée à l'arthrose du genou chez le rat Sprague-Dawley**

Présentée par :

Catherine Estelle Ferland-Legault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Younès Chorfi, président-rapporteur

Pascal Vachon, directeur de recherche

Sheila Laverty, co-directrice

Joane Parent, membre du jury

Philippe Sarret, examinateur externe

Jacques Lussier, représentant du doyen de la FES

Résumé

La douleur articulaire associée à l'arthrose est un problème clinique majeur, spécialement chez les personnes âgées. L'intensité de la douleur est souvent amplifiée lors de mouvement de l'articulation et principalement lors du soutien de la charge corporelle sur le membre lésé. Malheureusement, les traitements pharmacologiques proposés sont trop souvent associés à des effets secondaires néfastes et à une inefficacité pour le soulagement de la douleur à long terme.

Divers modèles murins sont utilisés en laboratoire de recherche pour des études précliniques de molécules aux propriétés analgésiques. Une évaluation comparative de la réponse comportementale douloureuse des animaux d'un modèle d'instabilité articulaire induit par le sectionnement du ligament croisé antérieur accompagné d'une méniscectomie partielle (le modèle ACLT+pMMx) et d'un modèle de dégénérescence articulaire induite par le monoiodoacetate (le modèle MIA) a permis de sélectionner un modèle approprié pour la continuité du projet. Les deux modèles ont démontré des lésions tissulaires, mais le modèle MIA a démontré une réponse douloureuse plus prononcée que le modèle ACLT+pMMx. Par l'analyse de la démarche, le modèle MIA a démontré une boiterie claire dans le patron de la démarche des animaux qui est associée à une lésion unilatérale. Le modèle MIA a donc été choisi pour la suite du projet.

La problématique principale dans la recherche sur la douleur associée à l'arthrose est une compréhension incomplète des mécanismes de douleur responsables de l'induction et du maintien de l'état de douleur. Il devient donc nécessaire d'améliorer nos connaissances de ces mécanismes en effectuant une caractérisation plus approfondie des modèles animaux employés pour l'évaluation de stratégies pharmacologiques analgésiantes. Afin de bien comprendre le modèle MIA, une caractérisation des événements moléculaires centraux lors de la progression du processus dégénératif des structures articulaires de ce modèle s'est effectuée aux jours 3, 7, 14, 21 et 28 post injection. Des mécanismes hétérogènes qui modulent l'information nociceptive en fonction de la progression temporelle de la pathologie ont été observés. Les changements du contenu

spinal des neuropeptides sélectionnés (substance P, CGRP, dynorphine A et Big dynorphine) ont débuté sept jours suivant l'injection de MIA. L'observation histologique a démontré que les dommages structuraux les plus importants surviennent entre les jours 14 et 21. C'est entre les jours 7 et 21 que les lésions démontrent le plus de similarités à la pathologie humaine. Cela suggère que lors d'une évaluation préclinique d'un traitement pharmacologique pour pallier la douleur articulaire utilisant le modèle MIA, l'étude doit tenir compte de ces événements afin de maximiser l'évaluation de son efficacité.

Puisque les traitements pharmacologiques conventionnels proposés pour le soulagement de la douleur ne font pas l'unanimité en terme d'efficacité, d'effets non désirés et de coûts monétaires parfois onéreux, les molécules de dérivés de plante deviennent une alternative intéressante. L'eugénol, le principal constituant de l'huile de clou de girofle, a été administré oralement pour une période de 28 jours chez des rats ayant reçu l'injection intra-articulaire de MIA afin d'évaluer son efficacité pour le traitement de la douleur articulaire. L'eugénol à une dose de 40 mg/kg s'est révélé efficace pour l'amélioration du patron de la démarche des animaux ainsi que pour la diminution de l'allodynie mécanique secondaire. De plus, les concentrations spinales de neuropeptides pronocicepteurs ont diminué chez les animaux traités. Par une évaluation histopathologique, l'eugénol n'a démontré aucune évidence d'effets toxiques suite à une administration *per os* quotidienne pour une période prolongée. Ces résultats suggèrent le potentiel thérapeutique complémentaire de la molécule d'eugénol pour le traitement de la douleur articulaire.

Mots-clés : Douleur articulaire, arthrose, modèle animal, rat, analyse de la démarche, allodynie mécanique secondaire, neuropeptides, eugénol, traitement pharmacologique.

Abstract

Pain is the most predominant clinical symptom associated with osteoarthritis (OA), mostly among older people. Joint movement and weight bearing often increase the pain intensity. Unfortunately, the proposed pharmacological treatments are frequently associated with side effects and ineffective for pain alleviation for long time periods.

Many murine models are used in laboratories for preclinical studies evaluating analgesic compounds. A comparative evaluation of the behavioral pain responses of animals with a joint instability model induced by the transection of the anterior cruciate ligament followed by a partial meniscectomy (the ACLT+pMMx model) and of an articular degenerative model induced by an intra-articular injection of monoiodoacetate (the MIA model) was conducted to select an appropriate model for the continuation of the project. Both models demonstrated articular lesions, however the MIA model demonstrated a clearer behavioral pain response over the ACLT+pMMx model. The gait pattern of the MIA model revealed a clear limping gait similar to that observed with unilateral OA in humans. The MIA model was chosen for the subsequent studies.

An unresolved issue in pain OA research is the lack of understanding of the pain mechanisms responsible for the induction and maintenance of the pain. Therefore, there is an urgent clinical need to improve the characterization of animal models to effectively discover novel pain relief pharmacological treatment strategies for OA patients. A characterization of the spinal pain molecular events during the progression of the joint degenerative process in the MIA model was performed on days 3, 7, 14, 21 and 28 post injection. Heterogeneous nociceptive central molecular events were observed in respect to the time course of the pathology's progression. Changes in selected spinal neuropeptide content (substance P, CGRP, dynorphin A, Big dynorphin) began 7 days following the MIA injection. Most severe joint structural damage on histology occurred between days 14 and 21 post injection. These results suggest that preclinical drug evaluation employing this model should be conducted between 7 and 21 days post injection when the lesions resemble most those of human OA.

As current pharmacological therapy for the alleviation of joint pain does not achieve the unanimity in respect to efficacy, side effects and cost, plant derivate compounds are now interesting alternatives to improve the situation. Eugenol, the main constituent of clove oil, was evaluated for its efficacy for alleviation of joint pain in rats who previously received an intra-articular injection of mono-iodoacetate to induce the MIA model. Eugenol, administered orally for 28 consecutive days at a dose of 40 mg/kg, improved gait pattern and reduced secondary mechanical allodynia. Furthermore, spinal concentrations of pronociceptive neuropeptides were also decreased in the treated animals. No toxic effects of the compound were identified on histopathological assessment of the various tissues. These results suggest that eugenol could be a potential therapeutic option for alleviating OA joint pain.

Keywords : Joint pain, osteoarthritis, animal models, rat, gait analysis, secondary mechanical allodynia, neuropeptides, eugenol, pharmacological treatment.

Table des matières

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xxvi
REMERCIEMENTS	xxxv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE	3
1. Étiologie de l'arthrose.....	4
1.1. Épidémiologie.....	6
1.2. Éléments déclencheurs.....	6
1.2.1. Facteurs de risque.....	6
1.2.2. Symptômes cliniques.....	7
1.3. Articulation du genou.....	8
1.3.1. Fonctionnement.....	8
1.3.2. Articulation du genou (grasset) chez le rat.....	8
1.3.3. Composantes.....	10
1.3.3.1. Os.....	10
1.3.3.1.1 Os sous-chondral.....	10
1.3.3.2. Cartilage articulaire.....	11
1.3.3.2.1. Chondrocytes.....	11
1.3.3.3. Matrice extracellulaire.....	11
1.3.3.4. Fibres de collagène.....	12
1.3.3.5. Ligaments.....	13
1.3.3.6. Ménisques.....	14
1.3.3.7. Capsule articulaire.....	15

1.3.3.8. Membrane synoviale	15
1.3.4. Neuro-anatomie	15
1.3.4.1. Innervation interne de l'articulation du genou	15
1.3.4.2. Nocicepteurs	18
2. Douleur	21
2.1. Mécanismes périphériques	22
2.1.1. Rôle des canaux sodiques dans la transmission de la douleur	22
2.1.2. Rôle des canaux calciques dans la transmission de la douleur.....	23
2.2. Cheminement du stimulus.....	24
2.2.1. Voies afférentes	24
2.2.2. Voies descendantes	29
2.3. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs	36
2.3.1. Glutamate	36
2.3.2. Acide γ -aminobutyrique	37
2.3.3. Neuropeptides.....	39
2.3.3.1. Substance P.....	40
2.3.3.2. Peptide lié au gène codant pour la calcitonine.....	42
2.3.3.3. Opiïdes endogènes.....	43
2.3.3.3.1. Dynorphines	45
2.3.4. Récepteurs vanilloïdes	47
2.3.4.1. Récepteur TRPV1	48
3. Pathophysiologie de l'arthrose.....	50
3.1. Réponse inflammatoire (sensibilisation) périphérique	50
3.1.1. Inflammation neurogène	55
3.2. Sensibilisation centrale	56
3.3. Catégories fonctionnelles de la douleur.....	60
3.3.1. Douleur inflammatoire.....	61
3.3.2. Douleur neuropathique.....	61
3.3.3. Douleur chronique	61

3.4. Anormalités des structures articulaires.....	62
3.5. Causes de douleur articulaire.....	66
3.5.1. Biomécanique de l'articulation du genou atteint d'arthrose.....	68
3.5.1.1. Patron de marche normal.....	70
3.5.1.2. Patron de marche pathologique.....	72
3.6. Traitements.....	73
3.6.1. Agents analgésiques.....	74
3.6.1.1. Acétaminophène.....	74
3.6.1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	75
3.6.1.3. Opioides.....	78
3.6.1.4. Analgésiques naturels.....	79
4. L'eugénol.....	82
4.1. Généralité et propriétés.....	82
4.1.1. Mode d'action de l'eugénol.....	83
4.2. Effets de l'eugénol sur la réponse inflammatoire.....	85
5. Évaluation de la douleur chez les modèles animaux d'arthrose.....	86
5.1. Modèle chirurgical d'arthrose chez le rat.....	87
5.2. Modèle induit par l'agent chimique mono-iodoacétate.....	88
5.2.1. Caractérisation histologique.....	88
5.3. Outils d'évaluation préclinique de douleur.....	89
5.3.1. Mesure de l'allodynie et de l'hyperalgésie.....	90
5.3.2. Analyse de la démarche.....	92
5.3.2.1. <i>CatWalk</i> TM	93
5.4. Analyse de marqueurs biologiques lors de la pathologie.....	95
5.4.1. Bioanalyse - Les principes de base de la méthode LC-ESI-MS/MS et autres techniques utilisant la spectrométrie de masse.....	96
5.4.1.1. Chromatographie liquide par phase renversée à haute performance.....	98
5.4.1.2. Source d'ionisation par jet dans un champ électrique.....	100
5.4.1.3. Spectrométrie de masse en tandem.....	102

6. Objectifs de l'étude	106
7. Hypothèses de recherche	108
CHAPITRE 2 : ARTICLES	109
Article 1 :	110
FERLAND C.E., LAVERTY S., BEAUDRY F., VACHON P.	
Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis	110
1.1. Abstract	111
1.2. Introduction	112
1.3. Experimental procedures	114
1.3.1. Animals	114
1.3.2. Experimental design	114
1.3.3. Induction of osteoarthritis	115
1.3.3.1. ACLT+pMMx surgery	115
1.3.3.2. MIA injection	116
1.3.3.3. Celecoxib-treated animals	116
1.3.4. Gait analysis	116
1.3.4.1. Gait parameters	117
1.3.5. Assessment of pain behavior	117
1.3.6. Histology of knee joints	118
1.3.7. Neuropeptide analysis	118
1.3.8. Statistical analysis	119
1.4. Results	120
1.4.1. Animals	120
1.4.2. Histological evaluation	120
1.4.3. Gait analysis for both MIA and ACLT+pMMx models	121
1.4.3.1. Velocity	121
1.4.3.2. Gait parameters	121
1.4.4. Secondary mechanical allodynia for both MIA and ACLT+pMMx models ..	122

1.4.5. Effects of celecoxib on gait analysis and secondary mechanical allodynia using the MIA model.....	123
1.4.6. Substance P and CGRP lumbar spinal cord concentrations.....	123
1.5. Discussion	123
1.6. Acknowledgements	127
1.7. References.....	128
1.8. Figure legends	134
Article 2 :	142
FERLAND C.E., BEAUDRY F., VACHON P.	
Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model.....	142
2.1. Abstract.....	143
2.2. Introduction.....	144
2.3. Materials & Methods	145
2.3.1. Animals	145
2.3.2. Experimental design.....	146
2.3.3. Induction of osteoarthritis	146
2.3.4. Eugenol and vehicle treatments.....	146
2.3.5. Behavioural studies.....	147
2.3.5.1. Gait analysis using the CatWalk.....	147
2.3.5.2. Von Frey filaments to evaluate secondary mechanical allodynia.....	148
2.3.6. <i>Post mortem</i> procedures.....	148
2.3.6.1. Spinal cord neuropeptide analysis.....	149
2.3.6.2. Nervous tissue accumulation of eugenol.....	149
2.3.6.3. Histological preparation and evaluation of knee joints.....	149
2.3.7. Data analysis.....	150
2.4. Results.....	151
2.4.1. Animal well being.....	151
2.4.2. MIA model	151

2.4.3. Behavioural assessment of pain.....	151
2.4.3.1. Effect of eugenol on gait parameters.....	151
2.4.3.2. Effect of eugenol on paw withdrawal threshold	152
2.4.4. Modulation of the nervous system by neuropeptide content in the spinal cord	153
2.4.5. Toxicological assessment.....	153
2.4.6. Histology	154
2.5. Discussion	154
2.5.1. Conclusions	158
2.6. Acknowledgements	158
2.7. References.....	159
2.8. Legends to figure.....	164
Article 3 :	168
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.....	
3.1. Abstract.....	169
3.2. Introduction.....	170
3.3. Experimental procedures	172
3.3.1. Chemicals and reagents.....	172
3.3.2. <i>In Vivo</i> experiments	172
3.3.3. Histological procedures.....	173
3.3.4. Synthesis of the internal standards.....	173
3.3.5. Spinal cord sample preparation	174
3.3.6. Instrumentation.....	174
3.3.7. Bioanalytical methods.....	174
3.3.8. Statistical analysis.....	175
3.4. Results.....	175

3.4.1. Histopathological changes.....	175
3.4.2. Analytical performance.....	176
3.4.3. Spinal peptide regulation.....	176
3.5. Discussion	177
3.6. Concluding remarks.....	180
3.7. Acknowledgements	180
3.8. References.....	180
3.9. Figure legends	189
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE	194
1. Caractérisation du modèle rat de douleur articulaire étudié	195
1.1. Justification du modèle d'arthrose utilisé dans le cadre de cette étude	195
1.2. Justification des évaluations comportementales choisies	196
1.2.1. Analyse de la démarche à l'aide du CatWalk	196
1.2.2. Allodynie mécanique secondaire à l'aide des fils de von Frey.....	201
1.2.3. Conclusion de l'évaluation comportementale des deux modèles	203
1.2.4. Évaluation histologique.....	205
1.2.5. Évaluation de biomarqueurs spinaux de douleur.....	205
1.2.6. Conclusion sur la sélection du modèle MIA pour la continuité du projet	207
1.3. Caractérisation du modèle MIA	207
1.3.1. Caractérisation histologique.....	207
1.3.2. Caractérisation du contenu spinal de neuropeptides spécifiques.....	209
1.3.2.1. Association du contenu spinal des neuropeptides et des lésions tissulaires	214
2. Évaluation de l'eugénol comme traitement analgésique pour diminuer la douleur articulaire chez le modèle MIA	216
CHAPITRE 4 : CONCLUSION	224
BIBLIOGRAPHIE	228
ANNEXE I	i

Article comme deuxième auteur concernant l'identification, la caractérisation et la quantification de neuropeptides spinaux de rat par spectrométrie de masse	i
1. Abstract.....	ii
2. Introduction.....	iii
3. Experimental.....	vi
4. Results and Discussion	ix
5. Conclusion	xii
6. Acknowledgements	xii
7. References.....	xiii
ANNEXE II	xxvi
Critical appraisal of the scientific communication entitled «Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain».....	xxvi
1. Introduction.....	xxvii
2. Results and conclusions description.....	xxxiii
3. Research project proposal.....	xxxix
4. References.....	xliv
ANNEXE III	xlix
Curriculum vitae	xlix

Liste des tableaux

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Table I: Mean (\pm SD) neuropeptides concentrations (pmol/g) in lumbar spinal cord enlargement at four weeks in controls, post OA induction and MIA animals with celecoxib treatment. Significant differences from the control group identified as ¹ ($P < 0.01$) and ² ($P < 0.02$).....p.136

ARTICLE 2

Table I: Mean (\pm SD) neuropeptide concentrations (pmol/g) in lumbar spinal cord enlargements in normal (no insult), vehicle-treated and eugenol-treated (intra-articular monoiodoacetate injected in the knee) animals (20 and 40 mg/kg eugenol, p.o.) 31 days post osteoarthritis induction. ^a = Significantly different in comparison to the normal animals ($P < 0.05$).....p.165

ARTICLE 3

Table I: The mass transitions for quantification in selected reaction monitoring (SRM) mode.....p.190

ANNEXE I

Table I: Amino acid sequence of selected neuropeptides.....p.xxv

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1. L'arthrose est une pathologie qui touche les articulations. Les principales parties du corps touchées par l'arthrose sont le genou, la hanche, la colonne vertébrale, la main et le pied. Les articulations les plus touchées sont représentées sur la figure par la couleur rouge. Tirée de The Arthritis Society, brochure informative, www.arthritis.ca.....p.5

Figure 2. Articulation du genou droit d'un lapin qui est anatomiquement identique à celle d'un rat. Cette illustration permet l'identification des composantes de l'articulation en démontrant les vues crâniale, latérale et caudale. Tirée de Barone, 1989.....p.9

Figure 3. Illustration démontrant les composantes du cartilage articulaire. Les fibres de collagène sont disposées différemment selon la zone du cartilage dans laquelle elles se situent. Les chondrocytes sont petits et allongés dans la zone superficielle alors qu'ils sont plus gros et aplatis dans la zone profonde près de l'os sous-chondral. Tirée et modifiée de Setton et al., 1999.....p.13

Figure 4. L'articulation du genou montrant les ménisques reposant sur les plateaux tibiaux et les ligaments croisés reliant le fémur et le tibia. Tirée de Marieb, 1998.....p.14

Figure 5. Anatomie d'un nerf périphérique. Le haut de la figure représente une coupe transversale d'un nerf composé de fibres nerveuses. La myéline qui entoure les fibres A β et A δ est de couleur noire. Au bas de la figure, l'anatomie distincte de chaque type de fibre est représentée. Plus le diamètre de la fibre est grand, plus la vitesse de conduction de la fibre est rapide. La gaine de myéline est responsable de la vitesse de conduction. Tirée de Marchand, 2005..... p.17

Figure 6. Représentation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nerveuses sensorielles entrent dans la moelle épinière par la corne dorsale et se retrouvent dans les 6 couches (laminae) distinctes de la moelle épinière. Les axones des fibres peuvent se retrouver dans plusieurs laminae. Tirée de Rang et al., 2001.....p.19

Figure 7. À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière se produit un premier contact synaptique entre les fibres afférentes nociceptives et des neurones de projection. Dans la lamina I, les neurones de projection reçoivent l'influx des fibres A δ . Ces mêmes neurones de projection reçoivent aussi des influx venant des fibres C par l'entremise d'interneurones dont le corps cellulaire se retrouve dans la lamina II. Les dendrites des neurones de la lamina V se retrouvent dans plusieurs laminae et font contact avec les axones terminaux des fibres afférentes (A δ et A β) ainsi qu'avec des interneurones qui ont un contact synaptique avec des fibres C. Tirée de Basbaum et Jessell, 2000.....p.26

Figure 8. Cheminement d'un stimulus nociceptif. Un neurone projette de la périphérie vers la moelle où il y a un premier contact synaptique avec un autre neurone. Le stimulus se propage vers les noyaux du thalamus par la voie spinothalamique ou vers différentes structures du tronc cérébral et les noyaux médians du thalamus par la voie spinoréticulaire. Un second contact synaptique se fait dans le thalamus avec un neurone impliqué. Les neurones des noyaux latéraux projettent vers les centres corticaux du cortex somatosensoriel, et les neurones des noyaux médians projettent vers les centres motivo-affectifs du système limbique et du cortex cérébral. Tirée de Marchand, 2005.....p.28

Figure 9. Schématisation de la théorie du portillon de Melzack et Wall. À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière, le neurone de projection est excité par l'influx nociceptif arrivant de l'axone terminal de la fibre C. Si l'intensité du stimulus nociceptif est grande, la fibre C inhibe l'activité de l'interneurone inhibiteur (haut de la figure). Lorsque les fibres de type A β sont recrutées, elles activent spontanément les interneurones inhibiteurs (bas de la figure). L'interneurone est donc excité par la fibre A β et inhibé par la

fibre C, ce qui modifie son rôle inhibiteur d'excitation du neurone de projection vers les centres supérieurs. L'apport d'excitation venant des deux types de fibres afférentes (nociceptive ou non) détermine l'intensité de la douleur. Tirée de Basbaum et Jessell, 2000.....p.31

Figure 10. Les différentes sources de modulation de l'inhibition spinale de la douleur. L'inhibition d'un neurone de projection (en rouge) par un interneurone (en noir) peut être altérée par divers changements potentiels tels : une réduction de l'influx de l'information nociceptive vers les interneurons inhibiteurs provenant des neurones afférents périphériques (en violet), d'interneurones spinaux excitateurs (en rouge) ou des voies descendantes supraspinales (1); la mort cellulaire (apoptose ou nécrose) de neurones spinaux inhibiteurs (2); une diminution de l'excitation ou une modification dans la décharge de l'information sensorielle par les neurones inhibiteurs (3); une diminution des concentrations de neurotransmetteurs inhibiteurs causée par une baisse de synthèse ou de recapture (4); une diminution de l'efficacité des récepteurs des neurotransmetteurs inhibiteurs (5); une diminution de force de courant intracellulaire d'ions Cl⁻ (6). Tirée de Sandkühler, 2009.....p.33

Figure 11. Représentation schématisée des projections de la lamina I vers le système limbique qui génère l'aspect affectif de la douleur et des projections de la lamina V vers le thalamus et les aires corticales qui génèrent l'aspect sensoriel discriminatif de la douleur. Lors d'une lésion nerveuse, une facilitation descendante passant par la SGPA (PAG sur la figure) et la MRV (RVM sur la figure) est augmentée. Cela active les récepteurs spinaux 5-HT₃ et amplifie l'activité ascendante de la corne dorsale. Cette boucle corticospinale expliquerait l'effet de l'humeur sur l'augmentation de la perception de la douleur et suggère une modification des effets de certains médicaments sur l'activité spinale. Tirée de Dickenson, 2004.....p.35

Figure 12. Schéma de l'origine des neuropeptides jusqu'au processus de neurotransmission. C'est à l'intérieur du corps cellulaire que la synthèse du précurseur de la protéine survient. Par la suite, le proneuropeptide qui est transporté à l'intérieur de vésicules (ronds verts) est dirigé par transport axonal jusqu'à la terminaison nerveuse présynaptique. C'est dans les vésicules que survient le clivage du proneuropeptide par l'action de protéases. Le neuropeptide actif est formé et prêt à être libéré par les vésicules dans la fente synaptique pour ensuite activer des récepteurs spécifiques localisés sur un autre neurone. Tirée de Hook et al., 2008.....p.40

Figure 13. Co-localisation des neuropeptides à l'intérieur des fibres afférentes primaires retrouvées dans la corne dorsale chez le rat. Les trois images de la rangée du haut illustrent par marquage immunocytochimique la co-localisation du CGRP et de la dynorphine à l'intérieur d'un ganglion de la racine dorsale. Les flèches indiquent l'immunoréactivité des cellules pour le CGRP et la dynorphine. Les trois images de la rangée du bas illustrent la présence de CGRP, de SP et de la prodynorphine dans les terminaisons nerveuses libres des fibres afférentes primaires à l'intérieur de la moelle épinière (L1-L3). Échelle de mesure : 10 µm. Tirée de Marvizon et al., 2009.....p.45

Figure 14. Schéma montrant les mécanismes moléculaires produits lors de la réponse inflammatoire suite à une lésion tissulaire en périphérie. Des médiateurs périphériques de l'inflammation retrouvés au site de la lésion vont soit stimuler ou sensibiliser les nocicepteurs. Ces médiateurs sont produits par des cellules du système immunitaire ou libérés par les fibres sensorielles. Ces médiateurs phosphorylent et activent des récepteurs et des canaux ioniques impliqués dans la transduction et la conduction de l'influx nociceptif. Suite à une sensibilisation post-transcriptionnelle, de nouveaux canaux et récepteurs sont produits, amplifiant ainsi la réactivité des nocicepteurs. Tirée de Fletcher, 2005.....p.53

Figure 15. Schéma illustrant les médiateurs de la corne dorsale de la moelle épinière. L'arrivée du potentiel d'action à la terminaison présynaptique de la fibre sensorielle provoque une entrée d'ions Ca^{2+} qui engendre une exocytose de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs dans la fente synaptique. Ces médiateurs agissent sur des récepteurs spécifiques retrouvés sur le neurone postsynaptique et induisent l'entrée d'ions Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique tout en activant des seconds messagers. Certains médiateurs activent la phosphorylation de récepteurs par l'entremise de protéines kinases. Des événements postsynaptiques peuvent générer à nouveau une activité présynaptique par la libération de médiateurs qui activent des récepteurs localisés sur la terminaison présynaptique. Tirée de Fletcher, 2005.....p.58

Figure 16. Les structures articulaires impliquées lors de l'arthrose et leurs modifications structurales. L'articulation normale du genou humain comporte un cartilage sans fissure et sans signe d'inflammation de la membrane synoviale (A). Le processus dégénératif de l'arthrose implique des modifications structurales au niveau du cartilage, de la membrane synoviale et de la capsule articulaire (B). Modifiée de Wieland et al., 2005p.64

Figure 17. Radiographie de la tête fémorale humaine d'un genou sain (A) et d'un genou atteint d'arthrose (B) démontrant la présence d'ostéophytes aux extrémités de l'os, d'un changement de la forme de l'os, de kystes à l'intérieur de l'os sous-chondral. Tirée de Dieppe et al., 2005.....p.66

Figure 18. Représentation schématique d'une patte démontrant les phases et les différentes périodes de la phase d'appui composant un cycle de marche. Modifiée de Vincelette et al. 2007.....p.70

Figure 19. Illustration de la structure des enzymes cyclo-oxygénases 1 et 2 retrouvées au sein de la membrane cellulaire. L'action des COXs produit des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (A). Les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques se lie à un site non sélectif à l'intérieur des enzymes COX-1 et COX-2, ce qui permet de bloquer l'accès de l'acide arachidonique à l'intérieur du canal des enzymes et d'inhiber leur action (B). La différence structurale (présence d'une poche latérale sur la COX-2) des deux enzymes permet une liaison sélective des coxibs à l'intérieur du canal enzymatique de la COX-2. Les coxibs sont des molécules trop volumineuses pour pénétrer à l'intérieur du canal de la COX-1 et ne peuvent ainsi les bloquer (C). Tirée de Fletcher, 2005.....p.77

Figure 20. Structure moléculaire de l'eugénol. Source : www.pherobase.com.....p.82

Figure 21. Appareillage pour le test de von Frey utilisant des filaments de nylon calibrés. Les filaments sont appliqués sous la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal afin d'évaluer la sensibilité mécanique. Sources : (A) Laboratoire du Dr Pascal Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. (B) Laboratoire du Dr Eckart Bartnik, Sanofi-Aventis..... p.91

Figure 22. Appareillage pour l'évaluation de l'hyperalgésie thermique par le test de Hargreaves. Une stimulation thermique est appliquée sous la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal. Source : Photographie du laboratoire du Dr Pascal Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.....p.92

Figure 23. Illustration représentant l'appareil CatWalk™. L'animal déambule à sa propre vitesse dans un corridor opaque avec une surface de verre comme plancher. Lors de la pose des pattes du rongeur sur la surface de verre, la lumière est réfléchiée vers l'intérieur sous les pattes de l'animal. Sous le corridor, une caméra vidéo capte le patron de marche de l'animal. Cette caméra vidéo est reliée à un ordinateur qui analyse les images à l'aide du logiciel CatWalk™. Tirée du site internet de la compagnie Noldus (www.noldus.com).p.94

Figure 24. Schéma d'un spectromètre de masse. L'appareillage comprend l'assemblage de trois outils distincts et successifs : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur.
.....p.96

Figure 25. Les étapes d'une séparation d'un échantillon liquide dans une colonne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les formes géométriques représentent les différents composés retrouvés dans l'échantillon lors de l'injection dans la colonne chromatographique. Suite à l'injection de l'échantillon, les molécules interagissent avec la phase solide (interaction primaire). Les interactions sont variables d'une molécule à l'autre, ce qui occasionne des temps de rétention variés (élution). La séparation des molécules s'effectue selon les différentes interactions avec la phase solide et la phase liquide présentes dans la colonne. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.....p.99

Figure 26. Illustration d'une source d'ionisation ESI typique. Le liquide contenant les peptides traverse avec un faible débit (dans ce cas-ci 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) le capillaire pour former des ions en phase gazeuse par l'application à pression atmosphérique d'un champ électrique. Les ions sont ensuite vaporisés par jet dans un champ électrique à haut voltage. Il en résulte de petites gouttelettes chargées qui sont transportées par le champ électrique vers l'orifice du spectromètre de masse afin d'être analysées. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.....p.101

Figure 27. Schéma simplifié du processus d'évaporation des ions à l'intérieur de la source d'ionisation. Les gouttelettes formées subissent plusieurs fissions (explosions coulombiennes). Ces fissions réduisent leur taille et augmentent leur densité de charge. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.....p.102

Figure 28. Principes de bases de la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide et ionisation par jet dans un champ électrique (LC-ESI/MS/MS). Suite à la fragmentation des peptides retrouvés dans la solution, une analyse des ions produits est effectuée par un premier spectromètre de masse. Les ions subissent une dissociation par collision avec des molécules gazeuses à l'intérieur de la cellule de collision (collision cell). Ensuite, les ions fragmentés à nouveau sont mesurés par leur abondance en fonction de leur ratio m/z à l'intérieur du second spectromètre de masse, ce qui produit un spectre de masse en tandem pour les ions d'un peptide (MS sur la figure). Suite à l'analyse par un logiciel, une séquence d'acides aminés est produite pour chacun des peptides étudiés. Tirée de Cravatt et al., 2007.....p.103

Figure 29. Représentation du patron de fragmentation typique d'un peptide observé par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La nomenclature acceptée des ions fragments des peptides y est représentée. Les ions fragments qui portent l'extrémité N-terminale sont nommés a , b et c alors que les ions qui portent l'extrémité C-terminale sont nommés x , y et z . Le numéro placé en indice indique son contenu en acide aminé. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.....p.104

Figure 30. Exemple d'un spectre de masse, dans ce cas-ci de la substance P. La dissociation induite par la collision dans le spectromètre de masse produit une masse ionique (m/z) du fragment protéolytique. Les fragments de séquences d'acides aminés de la substance P sont détectés et groupés selon leur abondance en fonction de leur m/z . L'analyse des données obtenues se fait par la comparaison entre le spectre de masse obtenu et le spectre théorique retrouvés dans une base de données. Tirée de Beaudry et al., 2009.....p.105

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Figure 1. Complete femorotibial joint sections stained with SOFG. Normal 16 week old femorotibial joint (A). ACLT+pMMx model 4 weeks post surgery. Ulceration of articular cartilage on the lateral femoral condyle and loss of SOFG stain on the medial tibial plateau are observed (arrows) (B). MIA model 4 weeks after injection. Complete loss of articular cartilage and extensive bone remodeling are observed (C). Scale bar = 2.5 mm.....p.137

Figure 2. Gait parameters obtained from the CatWalk analysis for both OA models. Variations in the ipsilateral and contralateral hind limbs of the swing phase duration (Top), swing speed (Middle) and duty cycle (Bottom) for both the MIA model and the ACLT+pMMx model. Results from control animals are represented as the dotted lines. All parameters are expressed as a % of the baseline values. Data are presented as Mean \pm SEM. With the MIA model significant differences are present for all three gait parameters ($P < 0.02$) except for the swing phase duration and swing speed on day 8 and the duty cycle on days 8 and 12. With the ACLT+pMMx model the only significant difference was noted on day 1 of the duty cycle ($P < 0.002$). Data are presented as Mean \pm SEM. Statistics used are mixed linear model ANOVA and Bonferroni sequential correction.....p.138

Figure 3. Paw withdrawal threshold (g) evaluated with the von Frey hair test of the ipsilateral and contralateral hind limbs of the MIA model (A) and ACLT+pMMx model (B). Data are presented as Mean \pm SEM. * = significant difference between the two hind limbs ($P < 0.007$). Statistics used are paired independent *t*-test compared to controls...p.139

Figure 4. Effect of celecoxib and saline treatments on gait parameters in the MIA model. Differences (%) between the right and left hind legs for swing phase duration (Top), swing speed (Middle) and duty cycle (Bottom) are presented. Differences were noted only on days 1 and 3 post MIA-induction for the swing speed and the duty cycle when compared to

controls ($P < 0.02$). Data are presented as Mean \pm SEM. Statistics used are mixed linear model ANOVA and Bonferroni sequential correction.....p.140

Figure 5. Effect of celecoxib and saline treatments on von Frey paw withdrawal threshold of the ipsilateral hind limb using MIA model. Thresholds are expressed in grams. Data are presented as Mean \pm SEM. Celecoxib treatments relieved secondary mechanical allodynia ($P < 0.001-0.03$) except on days 18 and 23. Statistics used are paired independent t -test compared to controls.....p.141

ARTICLE 2

Figure 1. Gait parameters evaluated with the CatWalk analysis in male Sprague Dawley rats. Mean (\pm SEM) in the ipsilateral (intra-articular monoiodoacetate 3mg/30 μ l in the knee joint) and contralateral hind limbs of the swing speed, swing phase duration and duty cycle for the vehicle-treated, 20 and 40 mg/kg eugenol groups ($n = 6$ /group). All parameters are expressed as a % of the baseline values. With high dose eugenol treatment, significant differences are present for all three gait parameters when compared with the vehicle-treated animals ($P < 0.05$). Baseline (100%) is represented by the dotted line. Statistics used is mixed linear model ANOVA.....p.166

Figure 2. Mean (\pm SEM) paw withdrawal threshold (g) evaluated with the von Frey filaments of the ipsilateral hind limbs prior to and following intra-articular monoiodoacetate (3mg/30 μ l) in male Sprague Dawley rats. Daily treatments for 4 consecutive weeks of either the vehicle, 20 or 40 mg/kg eugenol were administered orally to each group ($n = 6$ /group) respectively. Statistics used are Friedman ANOVA and post hoc paired independent t -tests. * = $P < 0.01$, ** = $P < 0.02$p.167

ARTICLE 3

Figure 1. Time course of the histopathological events occurring in the left medial compartment of the femorotibial joint of rats after a single intra-articular injection of 3 mg of monoiodoacetate stained with Safranin O-fast Green. Articular structures of saline-injected control animals demonstrated the presence of proteoglycans in the overall cartilage covering both femur (up) and tibial (bottom) bone structures at days 3 (A) and 28 (G) following the injection. A reduction of proteoglycans stained with Safranin O was observed in both tibial and femoral cartilages 3 days (B), 7 days (C) and 14 days (D) following the MIA injections. At day 21, a severe loss of cartilage was observed with a clear bone remodeling process (E). Similar observations are visible at day 28 (F). Scale bar = 1 mm.....p.191

Figure 2. LC-MS/MS quantitative analysis of a standard peptide mixture using labelled Ac₂O internal standard. Comparison of the observed and nominal concentrations for five standard mixtures of SP (A), CGRP (B), DynA (C) and Big Dyn (D).....p.192

Figure 3. Histograms demonstrating the neuropeptides modulation over time in the MIA model of osteoarthritis. Data represent the relative ratios between MIA injected spinal cord lumbar enlargements concentration versus saline injected control concentration at each time point for substance P (A), calcitonin gene-related peptide (B), dynorphin A (C) and big dynorphin (D) (mean ±SD). * = versus control day 3 and ** = versus control day 28...p.193

CHAPITRE 3

Figure 1. Représentation de certains événements impliquant le système opioïde endogène sur la libération de neuropeptides pronocicepteurs à l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière. L'inhibition de la libération de vésicules remplies de glutamate (Glu), de CGRP et de SP se fait par l'interaction entre des molécules d'endomorphine 2 (EM-2) et les récepteurs μ . Le contenu d'EM-2 dans la terminaison nerveuse de la fibre afférente est augmenté par la libération de dynA par les interneurons ou les neurones de projections et son interaction avec les récepteurs κ . Tirée de Fichna et al. 2007.....p.211

ANNEXE I

Figure 1. CID spectrum of substance P for m/z 674 $[M+2H]^{2+}$ p.xviii

Figure 2. CID spectrum of CGRP for m/z 952 $[M+4H]^{4+}$ p.xix

Figure 3. CID spectrum of dynorphin A for m/z 716 $[M+3H]^{3+}$ p.xx

Figure 4. MS² identification of substance P in rat spinal cord.....p.xxi

Figure 5. MS² identification of CGRP in rat spinal cord.....p.xxii

Figure 6. MS² identification of dynorphin A in rat spinal cord.....p.xxiii

Figure 7. Example of LOQ chromatogram.....p.xxiv

Liste des sigles et des abréviations

° :	Degré
°C :	Degré Celsius
% :	Pourcentage
g :	Constante gravitationnelle
κ :	Récepteur opioïde kappa
μ :	Récepteur opioïde mu
μL :	Microlitre
μL/min :	Microlitre par minute
μm :	Micromètre
Aα :	Fibre A alpha
Aβ :	Fibre A beta
Aδ :	Fibre A delta
AC :	Adénylate cyclase
ACR :	<i>American College of Rheumatology</i>
ACLt :	<i>Anterior cruciate ligament transection</i>
ACLt+pMMx :	<i>Anterior cruciate ligament transection with partial menisectomy</i>
ADAMTS :	<i>A desintegrin-like and metalloproteinase with thrombospodin domain</i>

AINS :	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
amol :	Attomole
AMPA :	Acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionate
AMPC :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ASICS :	<i>Acid-sensitive ion channels</i>
ATP :	Adénosine triphosphate
BDNF :	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
Big Dyn :	Big dynorphin
Ca ²⁺ :	Ion calcique
Ca _v :	Canaux calciques à voltage dépendant
CCA :	Cortex cingulé antérieur
CCK :	Cholecystokinine
CID :	<i>Collision induced dissociation</i>
CFA :	<i>Complete Freund's adjuvant</i>
CGRP :	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CI :	Cortex insulaire

Cl ⁻ :	Ion chlorure
cm :	Centimètre
cm ² :	Centimètre carré
COX :	Cyclo-oxygénase
CPGs :	<i>Central pattern generators</i>
CSF :	<i>Colony-stimulating factor</i>
DMOADs :	<i>Disease modifying osteoarthritis drugs</i>
dynA :	Dynorphine A
dynB :	Dynorphine B
EM-2 :	Endomorphine-2
ESI :	<i>Electrospray ionisation</i>
fmol :	Femtomole
g :	Gramme
GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GC/MS :	<i>Gas chromatography/ mass spectrometry</i>
GF :	<i>Growth factor</i>
h :	Heure
H ⁺ :	Ion hydrogène (proton)

HNC :	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i>
HPLC :	<i>High performance liquid chromatography</i>
5-HT :	Sérotonine
5-HT ₃ :	Récepteur sérotoninergique
IASP :	<i>International Association for the Study on Pain</i>
IL :	Interleukine
iNOS :	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
KCC2 :	Cotransporteur potassium-chlorure de type 2
kg :	Kilogramme
K ⁺ :	Ion potassique
L :	Litre
L2 :	Vertèbre lombaire 2
L4 :	Vertèbre lombaire 4
L6 :	Vertèbre lombaire 6
LOX :	Lipoxygénase
LTP :	<i>Long term potentiation</i>
M :	Masse
mg :	Milligramme

mGLU :	Récepteur métabotrope du glutamate
Mg ²⁺ :	Ion magnésium
MIA :	Mono-iodoacétate
min :	Minute
mL :	Millilitre
mm :	Millimètre
MMP :	Métalloprotéinase
mol/L :	Mole par litre
MRV :	Médulla rostroventrale
ms :	Milliseconde
MS :	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS (MS ²) :	<i>Tandem mass spectrometry</i>
m/s :	Mètre par seconde
mV :	Millivolt
m/z :	Ratio entre la masse et le nombre de charge
<i>n</i> :	Groupe test d'individus
Na ⁺ :	Ion sodique
Na _v :	Canaux sodiques à voltage dépendant

N/FQ :	Nociceptine (ou orphanine FQ)
NF κ B :	<i>Nuclear factor κB</i>
ng :	Nanogramme
NGFs :	<i>Nerve growth factors</i>
NK :	<i>Natural killer cells</i>
NK1 :	Récepteur à la neurokinine
NKA :	Neurokinine A
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
NO :	Nitric oxide
NPY :	Neuropeptide Y
NRM :	Noyau de raphé magnus
ORL1 :	<i>Opioid receptor like 1</i>
<i>P</i> :	Niveau significatif
P2X ₃ :	Récepteur purinergique de type P2X ₃
PC1/PC2 :	Protéine convertases 1 et 2
PGs :	Prostaglandines
PGE ₂ :	Prostaglandine de type E-2
pH :	Mesure de l'acidité d'une solution (pH = -log [H ₃ O ⁺])

PK :	Prokineticine
PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
PO :	<i>Per os</i> (voie orale)
PWT :	<i>Paw withdrawal threshold</i>
RT-PCR :	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
s :	Seconde
SI :	Cortex somatosensoriel primaire
SII :	Cortex somatosensoriel secondaire
SD :	<i>Standard deviation</i>
SEM :	<i>Standard error mean</i>
SGPA :	Substance grise périaqueducule
SMOADS :	<i>Symptom modifying osteoarthritis drugs</i>
SNP :	Système nerveux périphérique
SNC :	Système nerveux central
SOFG :	Safranin O-fast Green
SOM :	Somatostatine
SP :	Substance P

SRM :	<i>Selected reaction monitoring</i>
TAC1 :	Gène de la préprotachykinine
Th :	<i>T-Helper cells</i>
TNF :	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1 :	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TOF :	<i>Time of flight</i>
TrkA :	Tyrosine kinase A
TRP :	<i>Transient receptor potential</i>
TRPV :	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
TRPM :	<i>Transient receptor potential melastatin</i>
TTXr :	Récepteur à la tétrodotoxine
US-FDA :	<i>United States Food and Drug Administration</i>
V :	Volt
VIP :	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
w/v :	Rapport de masse sur volume (<i>weight/volume</i>)

À ma fille, Stella

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier le Dr Pascal Vachon. En m'accueillant dans son laboratoire de recherche pour la durée d'un stage lors de mon baccalauréat, inconsciemment Dr Vachon a complètement changé ma vie. À ce moment, je n'envisageais pas de poursuivre des études graduées. Mais, son enthousiasme si contagieux pour la recherche m'a motivée à revenir une année plus tard dans son laboratoire en tant qu'étudiante à la maîtrise. J'étais si impressionnée par ses connaissances scientifiques et sa générosité dans le transfert de ses connaissances, que je me suis dit qu'un jour je serai comme lui. Des professeurs aussi disponibles pour leurs étudiants, tant par sa présence au laboratoire que pour des échanges professionnels et personnels, il y en a peu. Merci Pascal. Ce Ph.D., c'est grâce à toi et je t'en serai toujours reconnaissante. J'espère fortement que nous aurons l'occasion de faire des collaborations éventuellement, et si elles ne sont pas scientifiques elles seront alors sportives sur deux roues!

Je tiens aussi à remercier la Dre Sheila Laverty. Un concours de circonstances nous a réunis et ce fût pour moi une rencontre marquante dans ma vie. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. L'année passée ensemble fût un test majeur dans l'évaluation de mes capacités à gérer la pression dans le domaine de la recherche. Grâce à vous, j'ai intégré un réseau de professionnels dévoués à la recherche. La première année, j'étais si intimidée que je ne croyais pas y avoir ma place. Mais vous avez cru en moi, parfois même plus que moi, et vous avez su me guider par vos nombreux conseils dans l'aspect relationnel de la recherche tout au long de ma formation. De plus, vous êtes pour moi un modèle à suivre de la femme carriériste qui doit concilier le travail et la famille. Vous avez été un mentor durant mes études graduées, et j'espère que vous le resterez dans les années futures.

Un grand merci à Dr Francis Beaudry pour sa disponibilité et sa patience à m'expliquer et à me réexpliquer certaines notions. Au début de ma formation, je n'aurais jamais cru écrire un jour un article sur des peptides. Grâce à toi, je l'ai fait! J'ai

spécialement apprécié la dernière année de ma formation où nous avons échangé et collaboré davantage ensemble. Merci d'avoir été là pour m'aider à réfléchir sur mon questionnement personnel par rapport à la continuité de mes études, à mon choix de carrière et à la conciliation travail-famille. Le fait que la porte de ton bureau soit toujours ouverte démontre une grande générosité de ta part et je suis certaine que plusieurs étudiants futurs t'en seront aussi reconnaissants. J'espère que nous aurons l'occasion de collaborer à nouveau.

Un énorme merci à Hélène Richard, technicienne au laboratoire du Dre Laverty. Hélène, tu es devenue mon amie durant mes études. Ta présence, même par courriel, m'a été d'une aide précieuse afin de ne pas sombrer dans la solitude des études graduées. Merci pour ta patience et pour le temps que tu as consacré à mes échantillons, spécialement lors de la première et la dernière année. J'ai appris énormément à tes côtés tant au niveau technique qu'au niveau personnel. Tu es une mère dévouée et un exemple à suivre. Merci pour tous tes conseils et je vais continuer de t'en demander!

Merci au Réseau canadien de l'arthrite d'avoir vu un potentiel en mes projets de maîtrise et de doctorat. À chaque année lors de mon retour de la conférence scientifique annuelle, ma motivation à poursuivre la recherche s'est vue multipliée par cinq. J'y ai fait de grandes rencontres, spécialement lors des déjeuners en compagnie de chercheurs renommés, ou encore lors des soupers accompagnés de gens atteints d'arthrose. Mais les rencontres les plus marquantes sont celles d'étudiants, spécialement ceux de l'Université de Sherbrooke, avec qui j'ai eu une complicité honnête et qui resteront mes amis de douleur avec les années. C'est dommage que le mandat du réseau se termine bientôt, car il n'y a aucun doute sur sa pertinence. J'espère un jour contribuer à nouveau dans un réseau axé sur la recherche, mais cette fois en tant que chercheure.

Merci aussi aux Fonds de la recherche en santé du Québec qui ont financé une partie de ce projet. J'espère que ces fonds publics de bourses d'études resteront une priorité au

sein du gouvernement québécois car le potentiel des étudiants en recherche en santé au Québec est très fort.

Un gros merci à Micheline St-Germain qui m'a guidée dès mon arrivée à la Faculté de médecine vétérinaire jusqu'à la fin de mes études graduées. Son sourire et son enthousiasme m'ont dégourdie plus d'une fois! Merci d'avoir été toujours disponible pour mes interrogations.

Un merci très spécial à Carmen, ma mère, et à Gabriel, mon conjoint, pour leur soutien incessant tout au long de ces années. Je vous ai cassé les oreilles avec mes nocicepteurs et mes peptides, parfois même jusqu'à l'énervement. Vous avez contribué plus que vous ne le pensez à cette thèse de doctorat. Merci de m'avoir encouragée à persévérer lors des moments plus difficiles et de m'avoir fait décrocher lorsqu'il le fallait. Votre appui m'est très cher, et mon amour pour vous est inconditionnel. Voilà, j'ai réussi!

Merci à ma famille et à mes amis qui, sans le savoir, ont contribué de façon indirecte à cette thèse. Par vos péripéties, vous avez su me changer les idées!

Un merci particulier à mes souliers de course qui m'ont accompagnée durant toutes ces heures de réflexion interne sur mon projet de recherche. Grâce à vous, j'ai maintenu un esprit sain dans un corps sain!

Introduction

L'arthrose qui affecte l'articulation du genou est une cause majeure de douleur articulaire. Cette douleur est rapportée comme étant la raison principale de consultation médicale, car elle altère la fonction de l'articulation et diminue la qualité de vie des patients atteints. Cette douleur engendre un stress émotionnel (anxiété, perte d'appétit, diminution de la qualité du sommeil) très important chez les gens atteints d'arthrose, tout comme chez les intervenants qui se sentent parfois impuissants dans leurs interventions dû à un manque de compréhension des mécanismes endogènes pouvant y apporter un soulagement efficace. Le phénomène physiologique de la douleur est un signal d'alarme qui avertit qu'une lésion tissulaire survient et qui oblige à adopter des comportements de garde pour éviter d'aggraver la lésion. Ce processus volontaire permet de limiter la sensation de douleur. Une abstinance de mobilisation de l'articulation ainsi que des modifications dans le patron de marche des gens atteints sont des indicateurs de détérioration de la performance mécanique de l'articulation. Par ailleurs, la douleur reliée à l'arthrose génère une sensibilisation des voies de la douleur en périphérie et au niveau central. Les changements moléculaires précis et les voies physiologiques de la douleur articulaire associée à l'arthrose ne sont pas clairement identifiées, et c'est pourquoi il est pertinent de poursuivre l'évaluation de ces modifications afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes endogènes de modulation de la douleur qui surviennent lors de l'initiation ainsi qu'en présence de la pathologie.

L'utilisation d'un modèle animal qui reproduit la pathologie est une procédure courante lors d'études précliniques. Le rat est un animal qui possède un génome similaire à l'humain, faisant de lui un animal approprié pour l'étude de traitements pharmacologiques potentiels. De plus, son coût d'utilisation modique en comparaison à de plus gros animaux le rend très populaire. Conséquemment, un nombre croissant de modèles murins a vu le jour ces dernières années, ce qui rend difficile la sélection du modèle le plus approprié pour l'objectif de l'étude. Il est évident qu'un modèle animal qui développe la pathologie de façon spontanée est le choix idéal, mais la progression de la pathologie peut prendre des mois, voire des années. C'est pourquoi des modèles induits par des agents chimiques sont

de plus en plus utilisés. Ils reproduisent des lésions similaires à la pathologie en un laps de temps très rapide.

Dans un premier temps, l'étude s'est concentrée sur le choix du modèle en comparant un modèle induit par une chirurgie et un modèle induit par un agent chimique. Par la suite, une caractérisation par des évaluations comportementales, histologiques et biochimiques chez le modèle sélectionné a permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes responsables de l'induction et du maintien de la douleur chez ce modèle.

Actuellement, il n'existe pas de traitement pharmacologique qui inhibe ou arrête les dommages structuraux conséquents à la pathologie. Les traitements ciblent principalement la diminution des symptômes, mais malheureusement les agents analgésiques synthétiques sont trop souvent associés à des effets secondaires et/ou à une inefficacité suite à un traitement prolongé. Dans certaines sociétés, les dérivés de plante sont couramment utilisés pour leurs vertus analgésiques et pourraient s'avérer efficace comme traitement complémentaire pour diminuer la douleur associée à l'arthrose. Le clou de girofle est reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoire et analgésique, et est utilisé depuis des années en dentisterie comme traitement topique lors de douleurs gingivales. Récemment, le principal constituant de l'huile de clou de girofle, l'eugénol, a démontré un effet analgésique chez un modèle rat de douleur neuropathique. Une évaluation des effets analgésiques chez un modèle rat de douleur articulaire associée à l'arthrose a été effectuée afin de déterminer son potentiel thérapeutique.

L'ensemble des études réalisées dans le cadre de ce projet a permis une meilleure connaissance de certains mécanismes associés à la douleur chez le modèle MIA. De plus, l'exploration des effets analgésiques de l'eugénol a été réalisée afin d'identifier une nouvelle voie thérapeutique impliquant une molécule vanilloïde comme alternative aux traitements pharmacologiques courants pour la douleur articulaire.

CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Étiologie de l'arthrose

L'arthrose est une pathologie articulaire caractérisée par une dégénérescence progressive des tissus composant l'articulation. Flores et Hochberg (2003) définissent l'arthrose comme étant un ensemble de pathologies distinctes qui résulte d'événements biologiques et mécaniques qui déstabilisent la relation normale de synthèse et de dégradation des tissus d'une articulation. L'arthrose se manifeste par des changements morphologiques, biomécaniques, moléculaires et biochimiques au niveau des cellules et de la matrice extracellulaire (Sharma et Kapoor, 2007).

Lorsqu'un patient développe l'arthrose, il peut en souffrir pour le reste de ses jours, et généralement, la sévérité de la douleur et de l'inaptitude augmente (Buckwalter et Martin, 2006). L'étiologie de l'arthrose reste jusqu'à présent toujours incertaine. La pathologie est diagnostiquée lorsqu'elle devient symptomatique, ce qui se produit dans la majorité des cas lorsque les altérations au niveau des structures articulaires sont déjà bien avancées.

L'arthrose touche principalement les articulations qui supportent le poids corporel, c'est-à-dire la colonne vertébrale cervicale et lombosacrée, la hanche, le genou et la première articulation métatarso-phalangienne (Figure 1). Dans certains cas, elle affecte aussi des articulations qui sont grandement sollicitées telles que les articulations de la main (interphalangienne distale, interphalangienne proximale et carpo-métacarpienne du pouce). Généralement, l'arthrose n'affecte pas la cheville, le poignet, le coude et l'épaule (Felson, 2003).

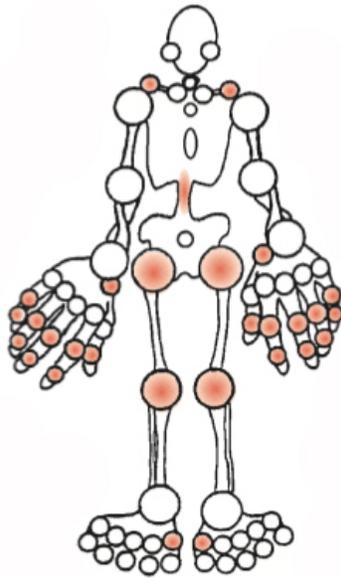


Figure 1. *L'arthrose est une pathologie qui touche les articulations. Les principales parties du corps touchées par l'arthrose sont le genou, la hanche, la colonne vertébrale, la main et le pied. Les articulations les plus touchées sont représentées sur la figure par la couleur rouge. Tirée de The Arthritis Society, brochure informative, www.arthritis.ca.*

Un des premiers signes d'arthrose est observé par une diminution de liberté de mouvement de l'articulation. La limitation de mouvement peut être due à l'incongruité ou à la perte de cartilage articulaire, à des contractures ligamentaires, capsulaires ou musculaires, à des ostéophytes, à des fragments intra-articulaires de cartilage, d'os ou de ménisque (Buckwalter et Martin, 2006). Les symptômes cliniques associés sont la douleur, un inconfort et un affaiblissement fonctionnel de l'articulation atteinte incluant une perte de mobilité et un dysfonctionnement.

1.1. Épidémiologie

L'Agence de la Santé Publique du Canada rapporte que l'arthrose atteint plus de 4 millions de canadiens âgés de 15 ans et plus, soit 16% de la population globale. Suite au vieillissement rapide de la population, il est attendu que la prévalence de la pathologie augmentera jusqu'à 20% en 2031 (Butler-Jones, 2009). L'Organisation Mondiale de la Santé estime que l'arthrose est la huitième principale maladie non fatale diminuant la qualité de vie, après les anomalies congénitales et la schizophrénie. L'arthrose est classée sixième au niveau mondial des causes majeures d'incapacité, et se placera au quatrième rang d'ici 2020 (Woolf et Pfleger, 2003).

1.2. Éléments déclencheurs

La pathologie se développe le plus souvent en l'absence de cause précise de la dégénérescence articulaire. Cette situation est identifiée dans la littérature en tant que stade primaire d'arthrose, ou idiopathique (Buckwalter et Martin, 2006). Par contre, l'arthrose de stade primaire survient rarement chez les gens âgés de moins de 40 ans (Buckwalter et Martin, 2006). Lorsque la condition survient suite à une blessure traumatique ou suite à l'identification de la cause (conditions métaboliques, anomalies anatomiques, arthrite inflammatoire), elle est dite de stade secondaire (Sharma et Kapoor, 2007). L'arthrose de stade secondaire peut survenir chez de jeunes adultes.

1.2.1. Facteurs de risque

En plus des causes identifiées de l'arthrose de stade secondaire, des facteurs de risque sont rapportés dans la littérature. La prédisposition génétique, la masse corporelle, le sexe, l'augmentation de la densité osseuse, les faiblesses musculaires, la laxité articulaire (instabilité), la sédentarité ou à l'opposé la surutilisation, un mauvais alignement articulaire (varus / valgus) ainsi que les blessures articulaires sont tous des facteurs de risques pouvant

contribuer à l'apparition de la condition (Buckwalter et Martin, 2006; Sharma et Kapoor, 2007). Il est rapporté que la prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge, et que ce facteur de risque est le plus important de tous. Chez l'homme, après l'âge de 40 ans, la prévalence de l'arthrose augmente rapidement lors de chaque décennie vécue, et l'incidence est plus grande chez les femmes que chez les hommes (Buckwalter et Martin, 2006).

Chez les animaux, l'arthrose est couramment diagnostiquée. Il est rapporté que la pathologie survient de façon spontanée ou suite à un traumatisme chez la souris (types C57BL6, STR/ORT, BALB/c et DBA/1), le rat (type Fisher 344), le cochon d'Inde (types Hartley et Dunkin-Hartley), le chat, le chien, le cheval et chez certains primates (Rhesus et Cynomolgus) (Pritzker et Kessler, 1995; Smith et Little, 2007). L'incidence de la pathologie est augmentée par l'obésité, l'âge, un traumatisme ou une anomalie génétique. Chez le chien, l'arthrose est la pathologie ostéo-articulaire la plus courante et elle est la cause principale de consultation vétérinaire lors de problème orthopédique (Mele, 2007). La prévalence est plus grande chez les races de grande taille, malgré que la pathologie puisse survenir chez toutes les races. Pour toutes les espèces, l'arthrose touche principalement les articulations qui soutiennent le poids corporel: les hanches, les grasset/genoux, les épaules, les coudes ainsi que les vertèbres lombaires.

1.2.2. Symptômes cliniques

Puisque plusieurs facteurs de risque ayant une variabilité intrinsèque prédisposent à l'arthrose, il n'est pas surprenant que la présentation clinique de la pathologie soit très variée en terme de sévérité et de progression temporelle. Malgré cette hétérogénéité, certains signes cliniques de l'arthrose sont rapportés sous forme de symptômes. Les symptômes courants de l'arthrose sont de la douleur, une rigidité articulaire conduisant à un affaiblissement fonctionnel, ainsi qu'une altération structurelle de l'articulation affectée. Parmi ces symptômes, la douleur prédomine et elle est la raison principale pour une consultation clinique (O'Reilly et Doherty, 2003).

1.3. Articulation du genou

Une articulation est définie comme l'union de deux ou plusieurs pièces osseuses ou cartilagineuses (Guay et Chapleau, 1991). Il existe différents types d'articulation chez les mammifères. Elles se distinguent entre elles par leur structure et leur physiologie (degré de liberté de mouvement). L'articulation du genou est dite composée car elle est réunie par plus de deux os et est de type synovial, car elle présente une cavité remplie de liquide synovial. Cette articulation est communément appelée l'articulation du grasset chez les mammifères domestiques (Barone, 1989).

L'articulation du genou est divisée en deux parties : l'articulation fémoro-patellaire, qui assure le maintien de la rotule sur la trochlée du fémur et l'articulation fémoro-tibiale, qui oppose l'extrémité proximale du tibia aux condyles du fémur (Barone, 1989). Les deux parties de l'articulation du genou sont complémentaires et forment ensemble l'articulation synoviale composée.

1.3.1. Fonctionnement

Le genou est une articulation de type diarthrose, ce qui signifie qu'elle est mobile (Guay et Chapleau, 1991). C'est une articulation à un degré de liberté (mono axiale) qui se déplace dans le plan sagittal seulement. L'articulation du genou est très mobile et peut accomplir les actions de flexion et d'extension du membre ainsi que la rotation de façon accessoire, car les mouvements de latéralité sont très réduits à cause de la tension des ligaments collatéraux (Barone, 1989).

1.3.2. Articulation du genou (grasset) chez le rat

Chez le rat, le grasset est semblable au genou de l'homme. Par contre, l'articulation de l'humain est plus large transversalement et aplatie dans le sens cranio-caudal que celle des mammifères domestiques (Barone et al., 1973). L'insertion de certains muscles tels que les fessiers modifie le site d'attachement des tendons. Cette différence reflète le fait que

l'articulation du genou d'un rat se maintient principalement en flexion comme celle du lapin (Figure 2), alors que celle de l'humain est en extension la majeure partie du temps. Les ligaments croisés antérieurs et postérieurs sont similaires à ceux des humains (Hildebrand et al., 1991). Une exception est retrouvée au niveau des ménisques alors que ceux des rats subissent une ossification partielle. La structure d'un os de rat adulte est similaire à celle des autres espèces mammifères à l'exception que les plaques de cartilage de croissance des os longs (physes) ne sont pas totalement résorbées (Krinke et al., 2000).

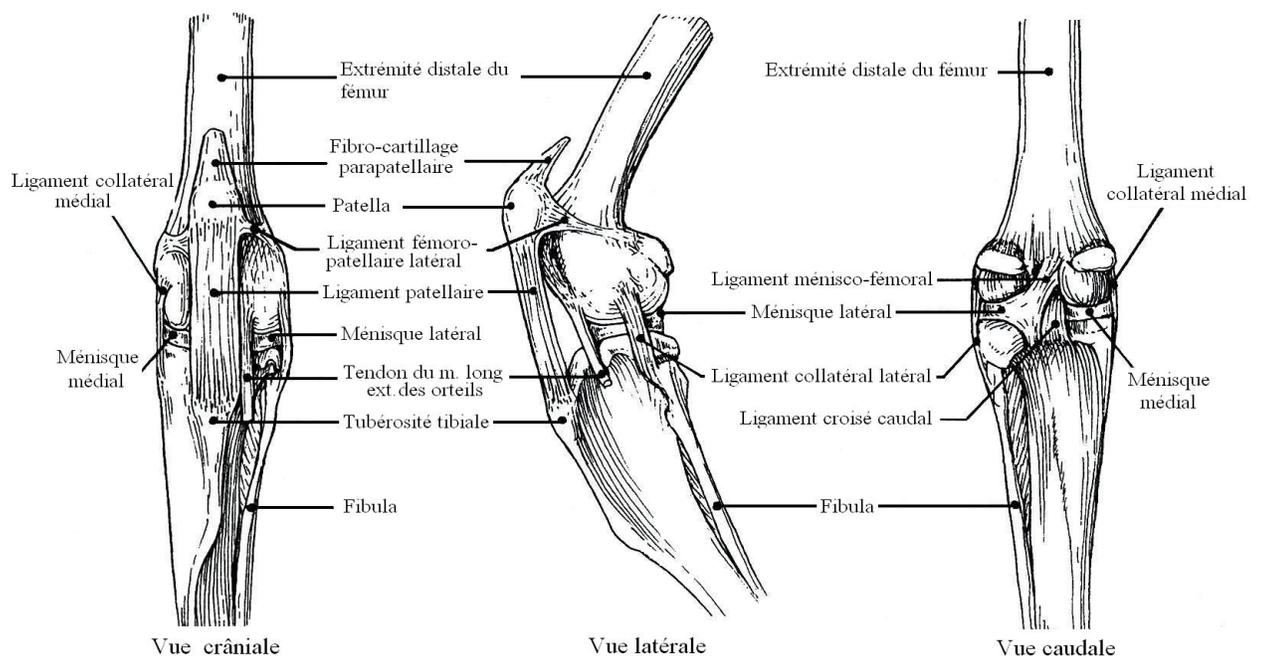


Figure 2. *Articulation du genou droit d'un lapin qui est anatomiquement identique à celle d'un rat. Cette illustration permet l'identification des composantes de l'articulation en démontrant les vues crâniale, latérale et caudale. Tirée de Barone, 1989.*

1.3.3. Composantes

1.3.3.1. Os

L'os est un tissu métaboliquement actif et dynamique en constant changement. Sa formation et son modelage sont influencés par plusieurs facteurs tels que les hormones et la nutrition. L'os est un tissu conjonctif dans lequel les cellules se retrouvent à l'intérieur d'une matrice composée des fibres de collagène et contenant des cristaux d'un complexe ionique : hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}\text{PO}_4\text{OH}_2$) (Fawcett et Jensh, 2002). La calcification de cette matrice crée une substance rigide qui a comme rôle de supporter et de protéger l'intérieur du squelette. L'os est composé de plusieurs types de cellules qui ont chacun leurs propres fonctions. Les ostéoblastes sécrètent de la matrice osseuse, du collagène, des protéoglycanes ainsi qu'une enzyme spécifique appelée phosphatase alcaline, qui joue un rôle important pour le dépôt de calcium phosphaté (Fawcett et Jensh, 2002). La membrane des ostéoblastes est pourvue de récepteurs de diverses hormones, vitamines et cytokines qui contrôlent l'activité de la cellule. Les ostéoclastes, un autre type de cellule osseuse, sont responsables de la résorption osseuse. Les os se remodelent et se résorbent continuellement avec la participation de ces deux types de cellules. De plus, l'os offre des sites d'attachement pour les tendons des muscles nécessaires aux mouvements (Dellmann et Eurell, 1998). Les structures osseuses sont reliées entre elles par des ligaments qui permettent à l'articulation de maintenir son axe articulaire et un certain degré de liberté.

1.3.3.1.1. Os sous-chondral

L'os sous-chondral est la partie de l'os qui se retrouve sous le cartilage articulaire. Ses fonctions sont de supporter le cartilage articulaire, de répartir la charge appliquée sur la structure osseuse et de pourvoir à l'approvisionnement de nutriments aux couches profondes du cartilage hyalin (Burr, 2003). L'os sous-chondral est très vascularisé et les vaisseaux sanguins ne touche pas le cartilage articulaire.

1.3.3.2. Cartilage articulaire

Les extrémités des épiphyses des os longs sont recouvertes d'une couche de cartilage hyalin, ou cartilage articulaire, mesurant de 2 à 7 mm d'épaisseur chez l'humain (Fawcett et Jensch, 2002) et environ 0,17 mm sur le fémur d'un rat d'âge mature de 7-8 semaines (Aigner et al., 2010). Macroscopiquement, le cartilage est un tissu blanc, brillant et translucide. Il est composé d'une vaste matrice extracellulaire très hydratée (Poole et al., 2007), de fibres de collagène de type II, de protéoglycanes (aggréganes), d'ions et d'eau (Heinegard et al., 2003). Ce cartilage baigne dans un lubrifiant appelé le fluide synovial. Il se nourrit de ce liquide synovial par imbibition (Guay et Chapleau, 1991). De plus, il est dépourvu de vaisseaux sanguins chez l'adulte (Dieppe et Lohmander, 2005). Le cartilage rend la surface de l'os lisse, ce qui permet un mouvement fluide de l'articulation et sans friction. Sans cartilage, la pression émise par le poids corporel sur un membre enclencherait un effet de frottement entre les os de l'articulation.

1.3.3.2.1. Chondrocytes

Les chondrocytes synthétisent et maintiennent de façon continue la matrice extracellulaire (Cormack, 1993). Ils représentent le seul type de cellules retrouvé dans le cartilage articulaire adulte (Goldring et Goldring, 2007). Près des extrémités cartilagineuses des os longs, les chondrocytes sont petits et allongés. Ils s'organisent et forment des colonnes longitudinales parallèles à la surface articulaire. Plus profond dans le cartilage, les chondrocytes sont de plus grosse taille et de forme plus ronde. Les chondrocytes ont une durée de vie très longue. Par contre, lors du processus de vieillissement, les cellules se dégèrent sans être remplacées, ce qui a pour conséquence un amincissement du cartilage articulaire (Dellmann et Eurell, 1998).

1.3.3.3. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire occupe l'espace entre les cellules du tissu conjonctif (Cormack, 1993). Elle est composée principalement d'eau, de fibres de collagène de type II

et de glycoaminoglycanes (Heinegard et al., 2003). Ces glycoaminoglycanes forment des protéoglycanes, molécules de plus grande taille, grâce à leur relation covalente avec d'autres protéines fixes. La qualité de la matrice extracellulaire est critique pour le maintien des propriétés fonctionnelles du cartilage articulaire telle que l'habilité de résister à la compression et à la tension tout en maintenant une flexibilité (Dieppe et Lohmander, 2005).

1.3.3.4. Fibres de collagène

Les fibres de collagène sont les fibres les plus abondantes dans le tissu conjonctif (Dellmann et Eurell, 1998). Ces fibres sont incolores et très minces (0,5 à 10 µm de diamètre). Le collagène est défini en tant que famille de protéines ayant une configuration moléculaire identique, mais conçues de chaînes polypeptidiques qui diffèrent dans ses séquences d'acides aminées. Elles forment des fibrilles de diamètres variés présentant une grande résistance sans élasticité. Plus de onze types de collagène ont été identifiés; le collagène de type I, type II et type III sont les plus communs et sont identifiés comme les collagènes interstitiels (Fawcett et Jensh, 2002). Ces trois types forment des fibres de tailles variables. À l'intérieur d'une articulation, le collagène de type I se retrouve dans le tissu conjonctif des tendons et des os. Il est synthétisé par les fibroblastes, mais peut également être produit par les ostéoblastes. Le collagène de type II est retrouvé en abondance dans la matrice extracellulaire du cartilage et est produit par les chondrocytes. Le collagène de type III est synthétisé par les fibroblastes. À différents niveaux dans l'articulation, les fibres de collagène sont organisées de façon à ce qu'elles puissent offrir une résistance maximale aux pressions appliquées sur l'articulation et au stress de compression lors du maintien du poids corporel.

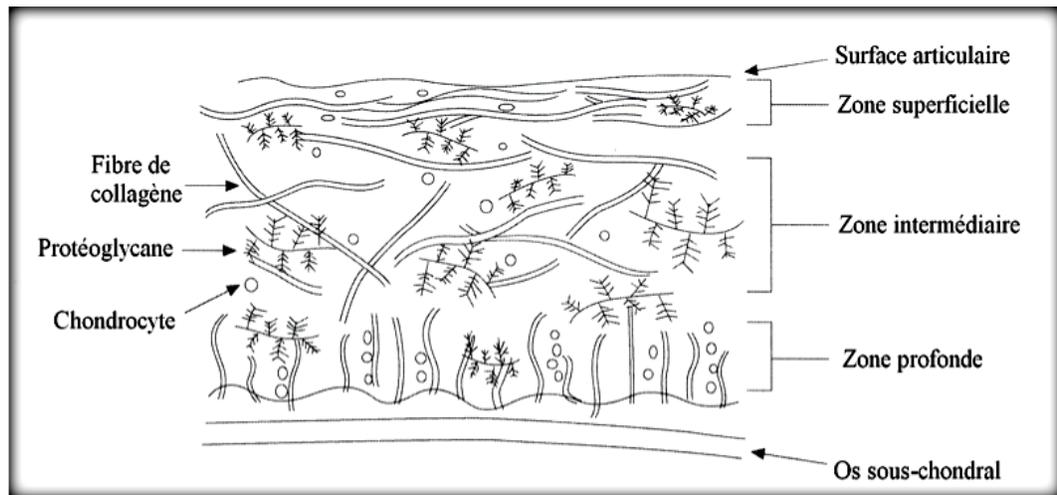


Figure 3. Illustration démontrant les composantes du cartilage articulaire. Les fibres de collagène sont disposées différemment selon la zone du cartilage dans laquelle elles se situent. Les chondrocytes sont petits et allongés dans la zone superficielle alors qu'ils sont plus gros et aplatis dans la zone profonde près de l'os sous-chondral. Tirée et modifiée de Setton et al., 1999.

1.3.3.5. Ligaments

Les ligaments sont constitués de tissu conjonctif composé de collagène. La fonction primaire d'un ligament est de relier un os à un autre dans une articulation. Les ligaments de l'articulation du genou possèdent différentes fonctions selon leur emplacement. Certains ligaments tels que les ligaments croisés (antérieur et postérieur) limitent la mobilité de l'articulation, et empêchent certains mouvements. Le ligament croisé antérieur a comme fonction de stabiliser l'articulation en s'opposant au glissement excessif du plateau tibial dans le sens caudo-crânial et de retenir les structures osseuses dans l'axe articulaire afin de limiter la rotation (Barone, 1989). Le ligament croisé postérieur a la fonction inverse.

1.3.3.6. Ménisques

L'articulation du genou est pourvue de deux ménisques insérés sur les condyles du tibia afin de minimiser le frottement entre les structures osseuses. Ils sont composés de fibrochondrocytes qui baignent dans une matrice contenant des fibres de collagène de type I. À l'exception des extrémités périphériques (1/3 de leur totalité), ils sont non vascularisés (Mine et al., 2000). Les ménisques sont de petites structures fibrocartilagineuses en forme de croissant, le ménisque médian étant plus grand que le latéral. Le bord interne d'un ménisque est beaucoup plus mince que son bord externe (Guay et Chapleau, 1991). Les deux ménisques forment un coussin dans l'articulation qui permet un contact intime entre les surfaces articulaires. En minimisant le frottement entre les structures osseuses, les ménisques contribuent au glissement fluide de l'articulation et à l'amortissement des impacts.

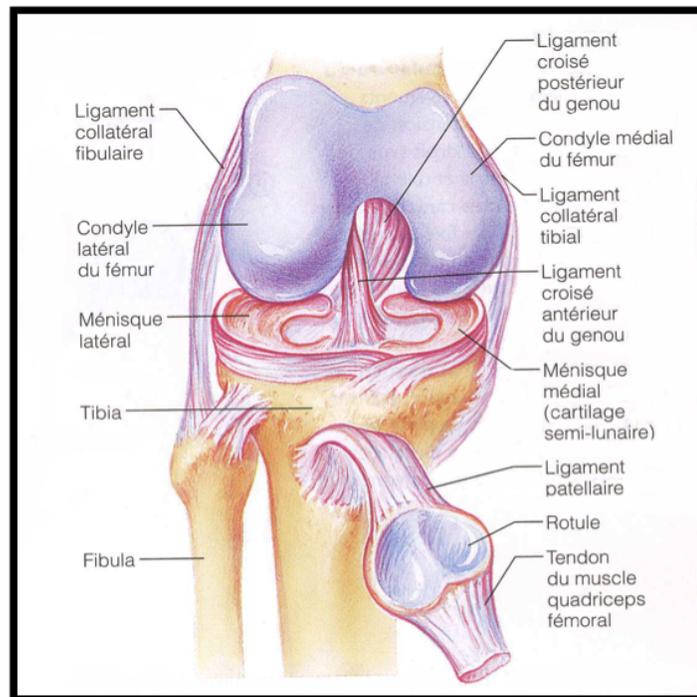


Figure 4. L'articulation du genou montrant les ménisques reposant sur les plateaux tibiaux et les ligaments croisés reliant le fémur et le tibia. Tirée de Marieb, 1998.

1.3.3.7. Capsule articulaire

La capsule articulaire est le manchon membraneux qui enferme l'articulation. Elle est constituée en majeure partie de fibres de collagène, mais aussi d'une membrane interne (synoviale) et d'une membrane externe (fibreuse). Cette dernière assure la protection et le maintien de l'articulation (Guay et Chapleau, 1991). La capsule articulaire contribue, conjointement avec les ligaments, à maintenir les structures de l'articulation en contact, et ainsi en assurer la stabilité.

1.3.3.8. Membrane synoviale

La membrane synoviale a pour fonction de nourrir et de lubrifier les surfaces articulaires en produisant le liquide synovial. Elle recouvre la face interne de la membrane fibreuse de la capsule et les surfaces osseuses intra-articulaires non recouvertes de cartilage. C'est une membrane conjonctive mince et transparente formée de deux couches. La couche interne est composée de tissu conjonctif lâche alors que la couche externe est pourvue de fibres élastiques (Guay et Chapleau, 1991).

1.3.4. Neuro-anatomie

1.3.4.1. Innervation interne de l'articulation du genou

L'articulation du genou est innervée par le système nerveux périphérique (SNP) composé de nerfs aux prolongements axoniques provenant des segments L2 à L6 de la moelle épinière (Fernihough et al., 2004). Les nerfs périphériques sont formés de faisceaux parallèles d'axones sensoriels et moteurs. Le corps cellulaire des axones des neurones sensoriels est situé dans les ganglions spinaux (Caterina et Julius, 2001; Marieb, 1998), leurs nerfs ayant pour fonction de transmettre l'information sensorielle de la périphérie à la racine dorsale de la moelle épinière via les fibres nerveuses (Figure 5).

Les fibres sensorielles sont classées selon leurs caractéristiques anatomiques et électrophysiologiques. Certaines fibres sensorielles sont entourées d'une gaine de myéline.

La myéline, enveloppe membranaire riche en lipides, des oligodendrocytes, permet d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux le long des fibres nerveuses. Plus le diamètre de la fibre est grand, plus la vitesse de conduction est rapide. Les fibres sensorielles myélinisées de type A α , ou motoneurones, ont un diamètre de 12-22 μm et une vitesse de conduction de 70-120 m/s (Coutaux et al., 2005). Ces fibres captent les influx afférents venant des fuseaux neuromusculaires à l'intérieur des muscles et des appareils de Golgi au niveau des tendons. Théoriquement, ce type de fibre n'innervent pas l'intérieur de l'articulation, mais reste impliqué dans le phénomène d'arthrose du genou. Les fibres A β myélinisées ont un diamètre de 6-12 μm et une vitesse de conduction de 35-75 m/s (Marchand, 2005; Purves et al., 2001). Les fibres de type A δ sont myélinisées, de diamètre de 1-5 μm et ont une vitesse de conduction de 5-30 m/s. Ensemble, les fibres de type A β et A δ comptent pour environ 20% de la totalité de l'innervation de l'articulation. Les nerfs sont aussi composés de fibres non myélinisées de type C. Ces fibres ont un diamètre inférieur à 2 μm et leur vitesse de conduction est de 0,5-2 m/s. Les fibres C peuvent être peptidergiques, ce qui signifie qu'elles synthétisent et libèrent des neurotransmetteurs protéiques (Porreca, 2010). Les fibres de type C comptent à elles seules pour environ 40% de l'innervation totale de l'articulation (Heppelmann et al., 1988; Vilensky, 2003). Le pourcentage restant de l'innervation totale de l'articulation, soit 40%, provient d'axones vasomoteurs du système nerveux autonome (sympathique) qui régularisent le flux sanguin des artères articulaires (Marieb, 1998; Vilensky, 2003).

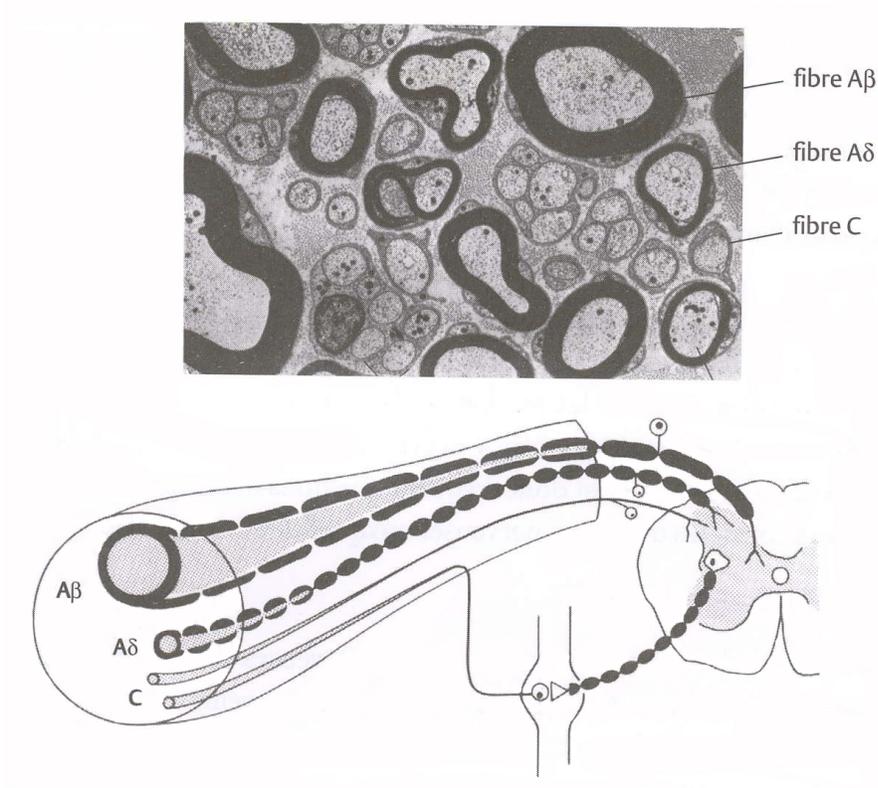


Figure 5. Anatomie d'un nerf périphérique. Le haut de la figure représente une coupe transversale d'un nerf composé de fibres nerveuses. La myéline qui entoure les fibres A β et A δ est de couleur noire. Au bas de la figure, l'anatomie distincte de chaque type de fibre est représentée. Plus le diamètre de la fibre est grand, plus la vitesse de conduction de la fibre est rapide. La gaine de myéline est responsable de la vitesse de conduction. Tirée de Marchand, 2005.

Les récepteurs constitués des branches périphériques des fibres sensorielles forment les terminaisons nerveuses libres, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas équipées de corpuscules ou de structures anatomiques spécialisées. Ces récepteurs sont chargés de réagir aux changements qui se produisent au niveau de l'articulation. Les récepteurs sensoriels sont retrouvés dans l'ensemble des structures articulaires, à l'exception du cartilage qui est dépourvu de fibres nerveuses (Kidd, 2006). Selon le type de stimulus (facteur agissant sur

une cellule en provoquant une réponse nerveuse) qu'ils captent, les récepteurs sont divisés en :

- mécanorécepteurs : Ils produisent des influx nerveux lorsque les tissus sont déformés par des facteurs mécaniques (toucher, pression, étirement, vibration). Ils protègent l'articulation de l'hyperextension, hyperflexion et de rotation hors de l'axe;
- thermorécepteurs : Ils réagissent aux changements de température;
- chimiorécepteurs : Ils sont sensibles aux substances chimiques (ions H⁺).

1.3.4.2. Nocicepteurs

Le système somesthésique a deux composantes principales : un système pour la détection des stimuli mécaniques (exemple la proprioception) incluant le toucher léger et les vibrations, et un système pour la détection des stimuli douloureux et de la température. Ensemble, ces systèmes donnent aux animaux la capacité de percevoir les informations somesthésiques qui agissent à tout moment sur leur corps et de détecter les situations potentiellement nocives.

Les nocicepteurs sont des fibres sensorielles sensibles aux stimuli potentiellement nuisibles. On en dénombre plus de 200/cm² (Navez et al., 1997). Les fibres qui composent les nocicepteurs proviennent de corps cellulaires situés dans les ganglions spinaux et leurs prolongements se dirigent vers la périphérie, la moelle ou le tronc cérébral. Les branches périphériques des axones nociceptifs ont des terminaisons libres. La plupart des nocicepteurs sont polymodaux et répondent à des stimuli nocifs de types mécaniques, thermiques ou chimiques. Les fibres qui acheminent les informations nociceptives sont soit des fibres myélinisées du groupe A δ , soit des fibres non-myélinisées du groupe C (Marchand, 2005; Purves et al., 2001). Des molécules sensorielles situées aux terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs convertissent les stimuli en potentiel synaptique. Lorsque leur amplitude est suffisamment élevée, des potentiels d'action sont amorcés et conduits par

les axones jusqu'à la corne dorsale de la moelle en empruntant les racines dorsales des nerfs spinaux (Schaible et Richter, 2004). Puisque les fibres $A\delta$ ont une vitesse de conduction relativement rapide, ces fibres sont responsables de la douleur dite primaire. Ces nocicepteurs sont responsables de la douleur localisée et précise tel un pincement de la peau. Elles sont sollicitées lors de stimuli thermiques et mécaniques de haute intensité. Les fibres $A\delta$ projettent vers la moelle et se retrouvent dans la lamina I de la corne dorsale de la moelle (Dickenson, 2004) (Figure 6).

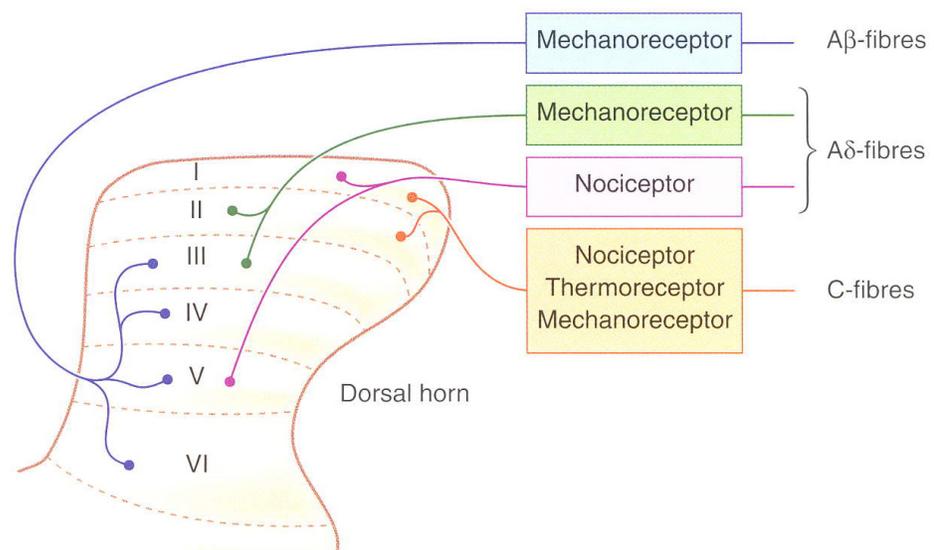


Figure 6. Représentation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nerveuses sensorielles entrent dans la moelle épinière par la corne dorsale et se retrouvent dans les 6 couches (laminae) distinctes de la corne dorsale de la moelle épinière. Les axones des fibres peuvent se retrouver dans plusieurs laminae. Tirée de Rang et al., 2001.

Les fibres de type C sont les plus sollicitées par la nociception chimique. Les terminaisons périphériques des fibres de type C sont activées par des stimuli d'origine mécanique, thermique ($> 45^{\circ}\text{C}$ ou $< 5^{\circ}\text{C}$) ou chimique, mais sont les plus sollicitées par la nociception chimique (Basbaum et Jessell, 2000). Elles sont donc des nocicepteurs polymodaux. Puisque leur vitesse de conduction est lente, elles transmettent l'information de façon diffuse et tardive. Ces fibres se retrouvent dans les laminae I et II de la corne dorsale de la moelle, et leurs projections axoniques peuvent se retrouver dans la lamina V (Dickenson, 2004). De plus, un troisième groupe de fibres est impliqué dans les mécanismes de transmission de la douleur ; les fibres $A\beta$. Ces fibres participent à la modulation de la douleur et leurs fonctions sont reliées à l'encodage de l'information non nociceptive, telle une pression cutanée légère. Ces fibres sont retrouvées dans les laminae III jusqu'à VI de la corne dorsale de la moelle (Dickenson, 2004). Les fibres $A\beta$ permettent de recruter des interneurons dans la substance gélatineuse des cornes dorsales de la moelle (laminae II, III, IV) qui ont un rôle important dans l'inhibition de la douleur (Basbaum et Jessell, 2000).

Les nocicepteurs sont largement distribués à l'intérieur de la peau et des tissus profonds. Il est à noter qu'un autre type de nocicepteur est rapporté : les nocicepteurs silencieux. Ces fibres ne sont pas activées par des stimulations nociceptives en temps normal. Par contre, lorsqu'il y a présence d'inflammation ou de certaines substances chimiques à l'intérieur de l'articulation, le seuil d'activation de ces récepteurs est grandement abaissé, et ces nocicepteurs deviennent actifs et commencent à transmettre l'information nociceptive au système nerveux central (SNC) (Basbaum et Jessell, 2000; McDougall, 2006a).

2. Douleur

Selon l'association internationale de l'étude sur la douleur (*International Association for the Study of Pain*, IASP), la douleur se définit comme une sensation ou une perception émotionnelle désagréable, consécutive à une altération tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle altération (Merskey et Bogduk, 1994). Elle est toujours subjective et varie d'un individu à l'autre. La douleur s'exprime à plusieurs intensités allant de faible à élevée pouvant menacer la survie. La douleur est un phénomène désagréable qui varie selon différentes caractéristiques physiologiques (sexe, âge) et psychologiques (éducation, état émotionnel incluant la dépression) des individus. La douleur représente un signal envoyé par le corps qui accroît la capacité de percevoir les informations somesthésiques agissant à tout moment sur le corps afin de détecter les situations potentiellement nocives.

La perception de la douleur implique la transmission de l'information nociceptive et la sensibilisation de ce système. La nociception constitue les mécanismes neurophysiologiques à l'origine de la perception de la douleur. La nociception se définit par la perception de la douleur liée à l'encodage et à la transmission de l'information nociceptive au système nerveux, engendrant la sensibilisation de ce système (Schaible et Richter, 2004). La sensibilisation apparaît suite à une application répétée de stimuli nociceptifs près de nocicepteurs qui, auparavant ne répondaient pas ou peu aux stimuli et, qui à présent deviennent plus réceptifs (Basbaum et Jessell, 2000). La sensibilisation peut être déclenchée par la répétition de stimulations douloureuses, par la chaleur ou par le biais de mécanismes inflammatoires, mécaniques et/ou chimiques. La nociception dépend de récepteurs, du nombre de récepteurs et de leur activation ainsi que de voies spécifiques pour le traitement de l'information du stimulus douloureux au niveau du système nerveux.

2.1. Mécanismes périphériques

Les mécanismes périphériques de sensibilisation des terminaisons libres des fibres sensorielles s'expliquent par la biochimie des cellules nerveuses. À l'état de repos, les cellules nerveuses ont un potentiel de repos variant de -60 à -70 mV entre les deux surfaces de leur membrane. Ce potentiel s'explique par une concentration intracellulaire de potassium (K^+) abondante et une concentration extracellulaire de sodium (Na^+) élevée (Purves et al., 2001). Lorsqu'il y a une lésion tissulaire en périphérie, par exemple à l'intérieur de l'articulation du genou, des substances pronociceptives (prostaglandines, bradykinine, histamine, substance P, adénosine triphosphate, sérotonine, etc.) sont libérées par le tissu lésé ou sécrétés par d'autres cellules de l'articulation. L'action de ces molécules sur les récepteurs excitateurs localisés sur la périphérie de la fibre modifie le potentiel membranaire du neurone et le rend plus positif. Si l'influx atteint le seuil de potentiel membranaire (-55 mV), la cellule se dépolarise et émet un potentiel d'action, signal qui propage les informations sensorielles le long de l'axone (Kandel et Siegelbaum, 2000a).

2.1.1. Rôle des canaux sodiques dans la transmission de la douleur

Lors de la dépolarisation cellulaire, les canaux ioniques transmembranaires sélectifs pour le Na^+ à voltage dépendant (Na_v) localisés en surface de la membrane axonique s'ouvrent et laissent pénétrer les ions de Na^+ à l'intérieur de la terminaison nerveuse. Plus de cent millions d'ions peuvent pénétrer en une seconde à l'intérieur d'un seul canal ionique (Koester et Siegelbaum, 2000). Les Na_v sont essentiels à la conduction de l'information nerveuse. Ils sont responsables des changements membranaires des cellules nerveuses qui peuvent contribuer à la production de potentiel d'action et/ou à la sensibilisation des fibres sensorielles (Porreca, 2010). Il existe plusieurs sous-types de canaux sodiques à voltage dépendant. Les canaux $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont grandement exprimés sur les nocicepteurs et s'accumulent aux terminaisons nerveuses libres. Le $Na_v1.8$ est responsable de la majorité des courants Na^+ à l'intérieur de la membrane lors de l'ascension de potentiels d'action dans les nocicepteurs (Porreca, 2010).

Il est rapporté que l'absence du canal $Na_v1.7$, due à une mutation génétique, engendre le syndrome d'insensibilité congénital à la douleur chez les individus affectés (Lampert et al., 2010). Ces individus ne ressentent pas la douleur, et ne possèdent aucun signal d'alarme pour les avertir d'un danger potentiel. Ils sont donc plus à risque de blessures, parfois fatales. Cette information est pertinente si l'on pense aux effets que pourrait avoir un traitement pharmacologique par des inhibiteurs des Na_v . Or, un tel traitement pourrait avoir des conséquences graves sur la conduction de l'information nerveuse si l'action du médicament n'est pas spécifique aux récepteurs.

2.1.2. Rôle des canaux calciques dans la transmission de la douleur

Les canaux calciques à voltage dépendent (Ca_v) ont pour fonction de moduler l'excitation neuronale et de libérer les neurotransmetteurs des terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs (Kandel et Siegelbaum, 2000b). Par l'intermédiaire d'enzymes spécifiques, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induit la synthèse de prostaglandines et modifie les seconds messagers (protéines kinases). Ceux-ci participent à la régulation de l'ARN et au codage des enképhalines (Navez et al., 1997). L'activation du type de canal N (N-Type) est critique pour la libération des neurotransmetteurs lors de la dépolarisation cellulaire (Porreca, 2010). Lors de douleur chronique, il est rapporté que l'expression du type N des Ca_v ainsi que leur fréquence d'ouverture sont augmentées (Porreca, 2010). Le type T des Ca_v est localisé sur les fibres afférentes et aussi sur les neurones postsynaptiques de la moelle épinière et donc il participe à leur sensibilisation par les influx nociceptifs afférents.

2.2. Cheminement du stimulus

Afin de transmettre l'information, les neurones sont organisés en circuits. Les connexions nerveuses entre les neurones d'un circuit s'effectuent à l'intérieur d'un enchevêtrement très dense de terminaisons axoniques, de dendrites, de synapses et d'expansions gliales. Dans ce circuit, un sens pour la circulation de l'information est mis en place. Les neurones transportant l'information vers le SNC sont dits afférents. À l'inverse, les neurones qui véhiculent l'information du SNC vers la périphérie (SNP) sont dits efférents. Les voies afférentes sont sensorielles et les voies efférentes sont motrices. Il y a également des interneurons qui n'interviennent que dans les aspects locaux d'un circuit. Tous ces neurones forment les constituants fondamentaux de tous les circuits neuraux.

2.2.1. Voies afférentes

L'information sensorielle relative à une blessure tissulaire est acheminée de la moelle vers le cerveau par différentes voies ascendantes. On en dénombre cinq majeures : les voies spinothalamiques, spinoréticulaires, spinomésencéphaliques, cervicothalamiques et spinohypothalamiques (Basbaum et Jessell, 2000). Les informations sensorielles nociceptives cheminent par deux voies principales : les voies spinothalamiques qui interviennent dans l'aspect sensori-discriminatif de la douleur, et les voies spinoréticulaires (ou spinothalamiques médianes) qui interviennent dans la perception de l'aspect motivo-affectif de la douleur. Les fibres des voies spinothalamiques possèdent des afférences rapides ainsi que des champs récepteurs précis qui se projettent vers le thalamus en passant par la substance grise périaqueducule (SGPA) et les noyaux du raphé, puis vers des aires somatotopiques du cortex sensoriel. Les fibres de la voie spinoréculaire ont des afférences et des champs récepteurs plus larges, majoritairement en provenance des fibres de type C, et ces projections se dirigent vers des régions précises du tronc cérébral, du thalamus et du cortex. Ces deux voies de la douleur ont des cheminements différents ainsi que des variances au niveau de leur implication dans le fonctionnement de la douleur. Cependant, leurs voies afférentes terminent toutes deux dans un des quatre centres cérébraux impliqués

dans la douleur : le cortex somatosensoriel primaire (SI), le cortex somatosensoriel secondaire (SII), le cortex cingulé antérieur (CCA) et l'insula dans le lobe du cortex insulaire (CI) (Marchand, 2005).

La principale voie de conduction de la nociception se compose de plusieurs neurones. Sur le site de la stimulation nociceptive en périphérie (exemple : genou), un neurone relaie les informations sensorielles jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière, en passant par le ganglion de la racine dorsale où il a son corps cellulaire. Le relais dans la moelle est une étape importante au niveau de laquelle les informations nociceptives sont modulées. Elle contient des neurotransmetteurs ainsi que des récepteurs qui vont moduler les afférences nociceptives avant leur transmission vers les centres supérieurs. Ainsi, il peut y avoir amplification du stimulus douloureux ou le blocage de l'influx nerveux.

Dans la moelle, un premier contact synaptique s'effectue entre le neurone périphérique et un neurone de projection auquel l'axone croise le plan sagittal et se prolonge en formant les voies ascendantes. Ce premier contact synaptique est considéré comme le site le plus significatif dans le cheminement du stimulus pour la douleur biomécanique (McCleskey, 2003). Il est important de mentionner que les cornes dorsales de la moelle renferment un important réseau de convergences synaptiques formé de fibres collatérales et d'interneurones (Figure 7). Les neurones de type A δ ou C font synapses avec d'autres neurones des laminae I, II ou III ou plus profondément, dans la lamina V de la corne dorsale de la moelle.

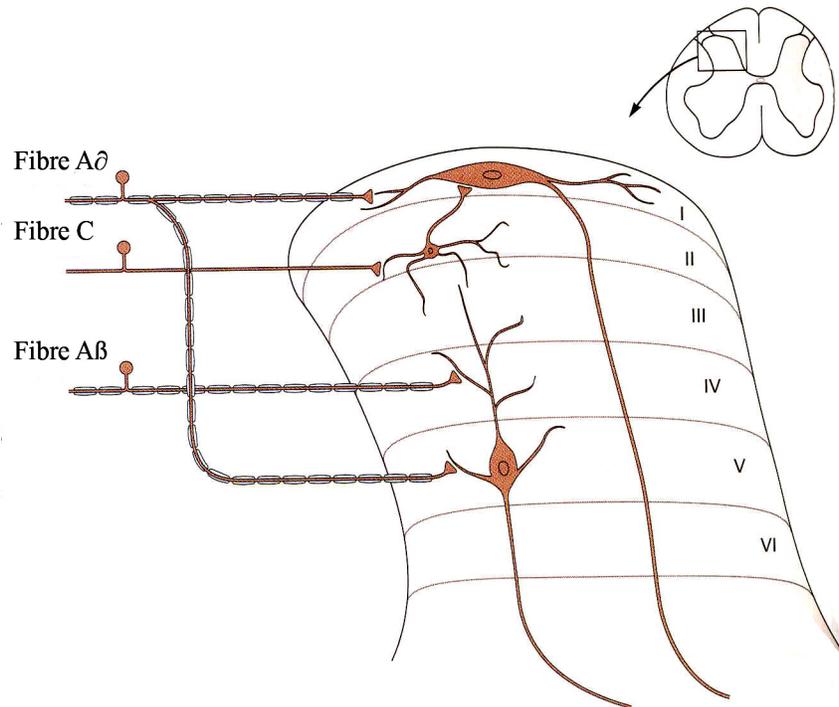


Figure 7. À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière se produit un premier contact synaptique entre les fibres afférentes nociceptives et des neurones de projection. Dans la lamina I, les neurones de projection reçoivent l'influx des fibres $A\delta$. Ces mêmes neurones de projection reçoivent aussi des influx venant des fibres C par l'entremise d'interneurones dont le corps cellulaire se retrouve dans la lamina II. Les dendrites des neurones de la lamina V se retrouvent dans plusieurs laminae et font contact avec les axones terminaux des fibres afférentes ($A\delta$ et $A\beta$) ainsi qu'avec des interneurones qui ont un contact synaptique avec des fibres C. Tirée de Basbaum et Jessell, 2000.

L'emplacement de la synapse dépend du type et de l'intensité du stimulus. D'après Dickenson (2004), les synapses initiales de la transmission douloureuse se produisent dans les laminae I et II. Dans la lamina I, des neurones activés par des nocicepteurs polymodaux de seuil très élevé sont retrouvés. Des neurones qui reçoivent une stimulation de la part des nocicepteurs polymodaux (les prolongements axoniques des fibres C), mais ayant une

variabilité marquée de seuils de stimulation sont retrouvés dans la lamina V (Basbaum et Jessell, 2000). Ces cellules de plus gros volume répondent à l'activité des trois types de fibres. Donc, elles répondent à des stimuli douloureux ($A\delta$ ou C), et à des stimuli non douloureux ($A\beta$). L'influx nerveux parcourt le neurone suite à la libération de neurotransmetteurs, qui lui croise immédiatement dans la moelle en passant par le canal de l'épendyme, pour ensuite se projeter dans l'espace ventrolatéral de la moelle afin de se retrouver le long de la voie spinothalamique (Figure 8). L'influx nerveux se propage tout le long de ce neurone qui se dirige vers le thalamus. Les axones ascendants dans la voie spinothalamique activent le système thalamocortical, celui-ci produisant la conscience de la sensation de douleur. Le système thalamocortical produit l'analyse du stimulus nociceptif en décrivant sa localisation, sa durée et son intensité.

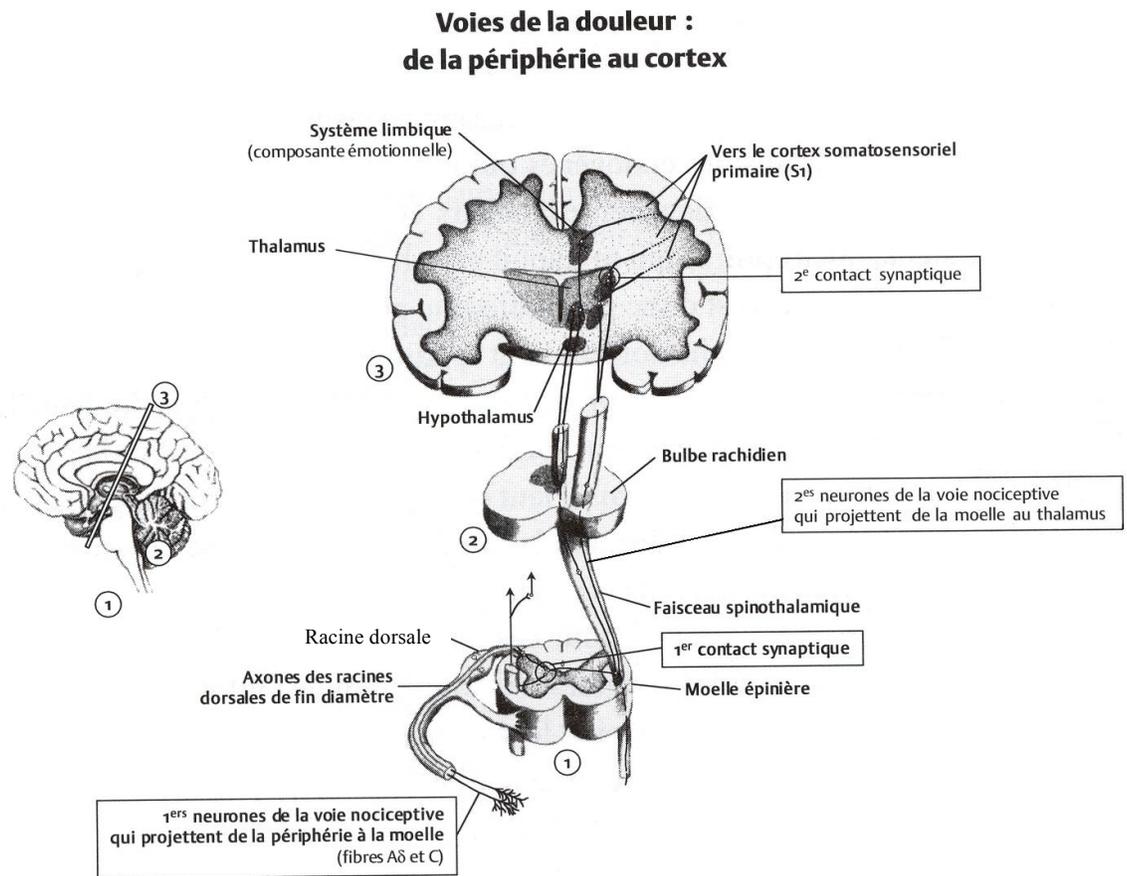


Figure 8. *Cheminement d'un stimulus nociceptif. Un neurone projette de la périphérie vers la moelle où il y a un premier contact synaptique avec un autre neurone. Le stimulus se propage vers les noyaux du thalamus par la voie spinothalamique ou vers différentes structures du tronc cérébral et les noyaux médians du thalamus par la voie spinoréticulaire. Un second contact synaptique se fait dans le thalamus avec un neurone impliqué. Les neurones des noyaux latéraux projettent vers les centres corticaux du cortex somatosensoriel, et les neurones des noyaux médians projettent vers les centres motivo-affectifs du système limbique et du cortex cérébral. Tirée de Marchand, 2005.*

À l'arrivée de l'influx nerveux dans le tronc cérébral (dans les noyaux latéraux et médians du thalamus), il survient un deuxième contact synaptique. Le thalamus joue un rôle déterminant dans la modulation de l'information nociceptive et est reconnu comme étant le centre d'intégration des informations nociceptives. Les noyaux thalamiques représentent l'emplacement où les projections des neurones des voies spinothalamiques et spinoréticulaires se séparent (Basbaum et Jessell, 2000). Les axones des noyaux latéraux projettent vers les aires somatosensorielles du cortex primaire (SI) dans la circonvolution post-centrale du lobe pariétal et secondaire (SII) dans le cortex pariétal. Les axones des noyaux médians projettent vers le CCA et le CI dans le lobe du cortex insulaire. Ces deux dernières régions corticales font parties du système limbique, le centre des émotions. Un stimulus douloureux ressenti cause des réactions désagréables. L'aspect émotionnel de la douleur est produit au niveau du système thalamocortical latéral médian ainsi que dans l'insula et le cortex préfrontal (Schaible et Richter, 2004).

2.2.2. Voies descendantes

La moelle est constamment sous l'influence de voies efférentes. Ces voies modulent le processus de nociception. Elles peuvent amplifier ou diminuer l'intensité du stimulus. Les voies descendantes ont pour fonction de recruter des interneurons dans la moelle pour produire une réponse analgésique par une réduction de l'activité des afférences nociceptives (Basbaum et Jessell, 2000). Ces voies inhibitrices de la douleur ont comme origine des régions spécifiques du tronc cérébral : la substance grise périaqueducale (SGPA) et le noyau de raphé magnus (NRM) de la médulla rostroventrale (MRV).

Lorsqu'un stimulus douloureux se propage dans le faisceau spinoréticulaire, le noyau parabrachial du thalamus (impliqué dans les réponses émotionnelles) reçoit plusieurs projections afférentes de neurones de la lamina I, qui sont exprimées par les récepteurs à la neurokinine 1 (NK1) spécifiques à la substance P. Le noyau parabrachial projette vers la SGPA, qui projette vers le NRM riche en sérotonine (acide aminé endogène inhibiteur de la douleur) (Vanegas et Schaible, 2004). À son tour, il renvoie aussitôt l'information

sensorielle devenue des efférences inhibitrices vers les différents niveaux spinaux passant par la voie dorsolatérale de la moelle épinière. Ce cheminement afférent-efférent forme un complexe en boucle qui permet au cerveau de moduler l'activité spinale (Dickenson, 2004).

Ce système d'efférences est capable de minimiser l'activité de neurones qui sont normalement responsables de la transmission de l'information nociceptive via des stimuli périphériques par l'entremise d'interneurones localisés dans la corne dorsale de la moelle (Schaible et Richter, 2004). Il y a aussi possibilité de recruter des champs récepteurs inhibiteurs qui annulent l'effet de sommation des surfaces. Le recrutement des fibres A β engendre également un effet d'inhibition sur la douleur perçue, ceci en relation avec la théorie du portillon de Melzack et Wall qui identifie le recrutement d'interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse de la corne dorsale par ces fibres dans la moelle (Basbaum et Jessell, 2000; Marchand, 2005) (Figure 9). De plus, les fibres A β jouent un rôle tonique de régulation des informations nociceptives. Une augmentation de la douleur suite à une stimulation nociceptive est produite en partie par le blocage sélectif des fibres de gros calibre (Marchand, 2005).

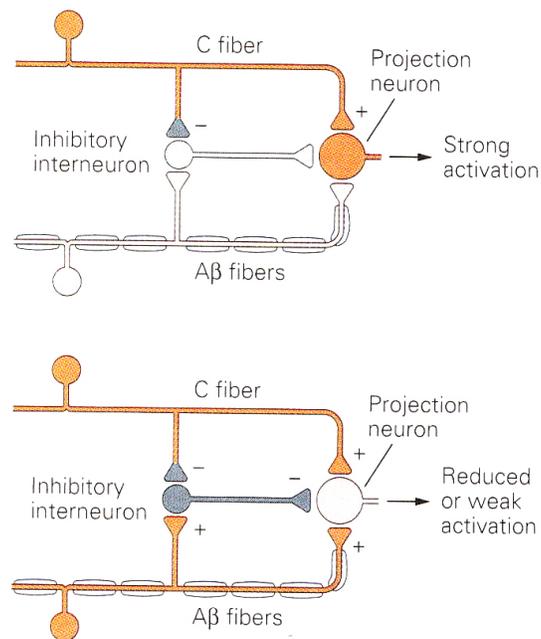


Figure 9. Schématisation de la théorie du portillon de Melzack et Wall. À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière, le neurone de projection est excité par l'influx nociceptif arrivant de l'axone terminal de la fibre C. Si l'intensité du stimulus nociceptif est grande, la fibre C inhibe l'activité de l'interneurone inhibiteur (haut de la figure). Lorsque les fibres de type A β sont recrutées, elles activent spontanément les interneurones inhibiteurs (bas de la figure). L'interneurone est donc excité par la fibre A β et inhibé par la fibre C, ce qui modifie son rôle inhibiteur d'excitation du neurone de projection vers les centres supérieurs. L'apport d'excitation venant des deux types de fibres afférentes (nociceptive ou non) détermine l'intensité de la douleur. Tirée de Basbaum et Jessell, 2000.

Plusieurs mécanismes peuvent modifier l'inhibition des neurones de projection à l'intérieur de la moelle épinière. Une simple altération des systèmes inhibiteurs module le signal nociceptif transmis vers les centres supérieurs (Figure 10). Une réduction de l'influx de l'information nociceptive vers les interneurones inhibiteurs ainsi qu'une mort cellulaire programmée (apoptose) ou une nécrose cellulaire de neurones spinaux inhibiteurs peuvent

altérer l'inhibition d'un neurone de projection (Sandkuhler, 2009). L'inhibition peut être modulée sans qu'il y ait une perte apparente d'interneurones. Suite à une lésion périphérique, une augmentation de l'excitabilité neuronale est observée par une altération de l'influx intramembranaire d'ions chlorure (Cl^-) des neurones de la corne dorsale (De Koninck, 2009). Cela survient en conséquence d'une diminution de la fonction de la pompe KCC2 à co-transporteur K^+/Cl^- retrouvée sur les terminaisons postsynaptiques des neurones de projection qui élimine l'action hyperpolarisante de certains neurotransmetteurs inhibiteurs (l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine). De plus, une diminution des concentrations de neurotransmetteurs inhibiteurs causée par une baisse de leur synthèse ou de leur recapture est aussi rapportée comme cause d'altération importante dans la modulation de l'inhibition de l'influx nociceptif (Satoh et Omote, 1996). Cette diminution engendre une baisse de synthèse de récepteurs spécifiques à ces neurotransmetteurs et rend ainsi le neurone moins sensible pour ces mêmes neurotransmetteurs inhibiteurs (Sandkuhler, 2009).

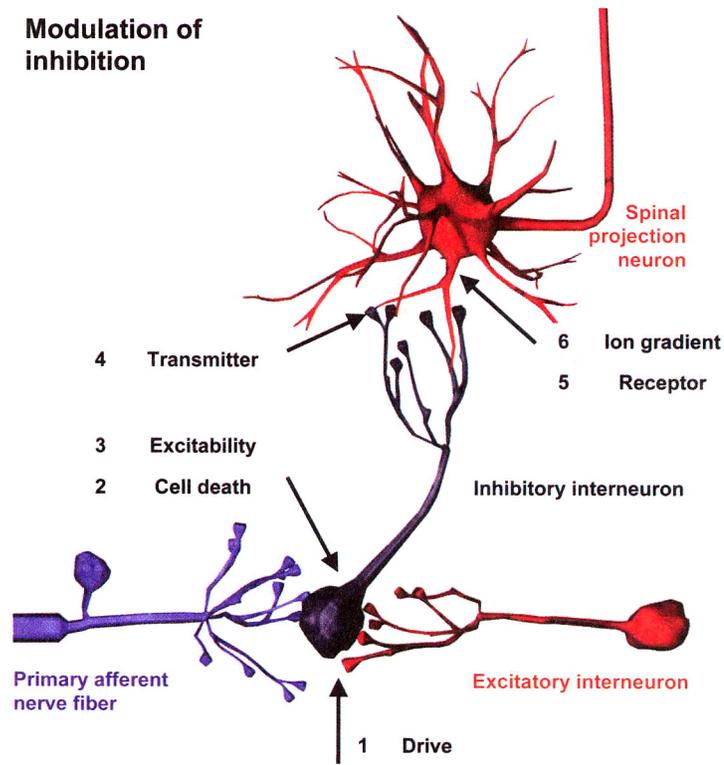


Figure 10. Les différentes sources de modulation de l'inhibition spinale de la douleur. L'inhibition d'un neurone de projection (en rouge) par un interneurone (en noir) peut être altérée par divers changements potentiels tels : une réduction de l'influx de l'information nociceptive vers les interneurons inhibiteurs provenant des neurones afférents périphériques (en violet), d'interneurones spinaux excitateurs (en rouge) ou des voies descendantes supraspinales (1); la mort cellulaire (apoptose ou nécrose) de neurones spinaux inhibiteurs (2); une diminution de l'excitation ou une modification dans la décharge de l'information sensorielle par les neurones inhibiteurs (3); une diminution des concentrations de neurotransmetteurs inhibiteurs causée par une baisse de synthèse ou de recapture (4); une diminution de l'efficacité des récepteurs des neurotransmetteurs inhibiteurs (5); une diminution de force de courant intracellulaire d'ions Cl^- (6). Tirée de Sandkühler, 2009.

Un autre mécanisme pouvant altérer l'inhibition implique les systèmes sensori-affectif et sensori-discriminatif de la douleur (Dickenson, 2004). Les neurones de projection avec leurs dendrites dans la moelle contrôlent l'excitation spinale ainsi que la sensibilisation en activant la voie sérotoninergique venant du NRM qui implique la sérotonine (5-HT). Les neurones du NRM projettent dans la moelle en passant par la partie dorsale du funiculus latéral et font un contact synaptique inhibiteur avec les neurones des laminae I, II et V de la corne dorsale. Ces derniers se dépolarisent par l'activation des récepteurs sérotoninergiques (5-HT₃) qui ouvrent les Ca_v. Selon Dickenson (2004), ce complexe en boucle du système sensori-affectif devient plus actif chez des personnes anxieuses ou déprimées. L'activation des récepteurs 5-HT₃ qui se retrouvent sur les terminaisons nerveuses des neurones périphériques conduit à la perception de la douleur dans le système sensori-discriminatif du cerveau. Dans ces circonstances, il devient difficile pour la personne de dissocier les deux aspects de la douleur. Ce complexe spinobulbospinal en boucle devient donc facilitateur descendant et excitateur de la douleur. Ces dérèglements physiologiques surviennent lors d'état de douleur chronique.

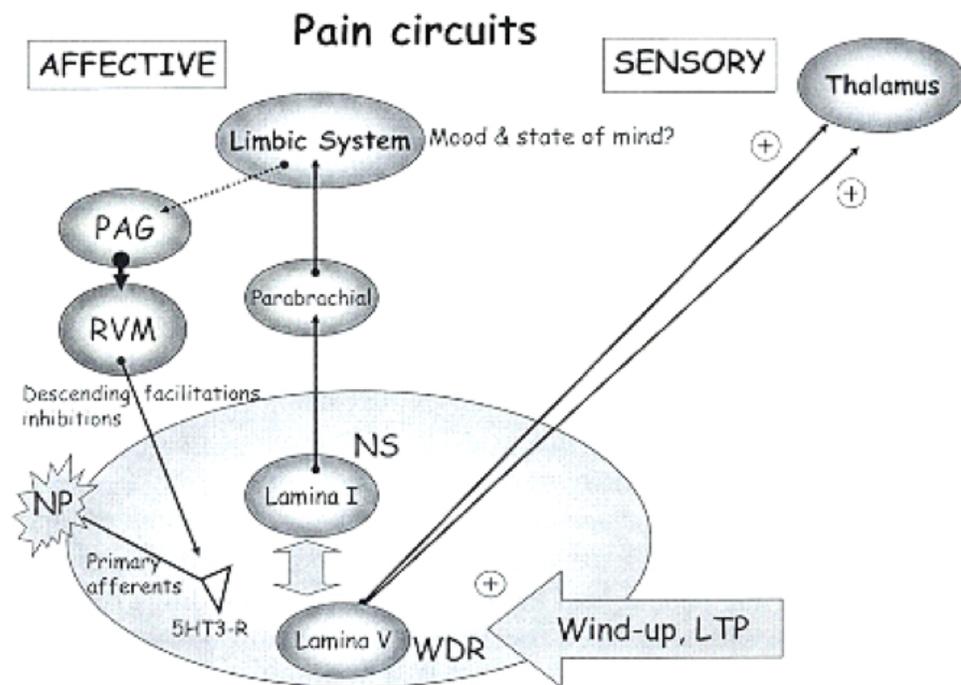


Figure 11. Représentation schématisée des projections de la lamina I vers le système limbique qui génère l'aspect affectif de la douleur et des projections de la lamina V vers le thalamus et les aires corticales qui génèrent l'aspect sensoriel discriminatif de la douleur. Lors d'une lésion nerveuse, une facilitation descendante passant par la SGPA (PAG sur la figure) et la MRV (RVM sur la figure) est augmentée. Cela active les récepteurs spinaux 5-HT₃ et amplifie l'activité ascendante de la corne dorsale. Cette boucle corticospinale expliquerait l'effet de l'humeur sur l'augmentation de la perception de la douleur et suggère une modification des effets de certains médicaments sur l'activité spinale. Tirée de Dickenson, 2004.

En conclusion, la plasticité neuronale à l'intérieur de la moelle épinière est modifiée suite à des changements physiopathologiques dans les nerfs périphériques associés à un traumatisme ou à l'inflammation. Les contrôles descendants inhibiteurs deviennent

facilitateurs et les influences excitatrices prédominent. Il est possible de dire que la voie afférente ayant l'influx nerveux prédominant diminuera l'action de la voie opposée descendante sans toutefois l'inhiber complètement.

2.3. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs

Dans les neurones des fibres sensorielles se retrouvent des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs. De façon générale, la neurotransmission se produit en terme de millisecondes et fonctionne parfois par l'entremise de cascades impliquant des seconds messagers. La neuromodulation implique des processus plus lents que la neurotransmission. Elle peut prendre quelques secondes jusqu'à plusieurs jours. Les neuromodulateurs augmentent ou diminuent l'efficacité de la transmission synaptique (Rang et al., 2007).

2.3.1. Glutamate

Parmi les neurotransmetteurs synthétisés par les neurones, l'acide aminé L-glutamate (glutamate) est le transmetteur le plus important dans la nociception (Purves et al., 2001; Schaible, 2004). Lors de l'arrivée du potentiel d'action à la terminaison nerveuse des fibres A δ ou C du neurone présynaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière, un influx intracellulaire d'ions calciques se produit. En réponse à l'entrée de Ca²⁺, des vésicules remplies de neurotransmetteurs s'accolent à la membrane présynaptique et fusionnent avec elle pour ensuite en libérer leur contenu dans la fente synaptique. Les molécules de glutamate qui se retrouvent dans la fente synaptique vont se lier à des récepteurs spécifiques sur la membrane postsynaptique, c'est-à-dire situés sur la terminaison nerveuse du neurone de projection. Ces récepteurs ouvrent alors des canaux spécifiques au niveau de la membrane cellulaire, modifiant ainsi leur conduction membranaire et le potentiel membranaire du neurone postsynaptique. Plusieurs types de récepteurs ionotropiques du glutamate ont été identifiés et sont nommés en fonction des

agonistes qui les activent: les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate) et kaïnate (acide kaïnate). Le glutamate agit aussi sur des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G (mGLU). Leur activation produit des réponses postsynaptiques excitatrices et engendre une sensibilisation centrale via des seconds messagers.

La libération de glutamate provoque une réponse synaptique très rapide des neurones de la corne dorsale par l'activation des récepteurs AMPA. Le récepteur NMDA quant à lui, s'ouvre et se ferme relativement plus lentement en réponse au glutamate. Il est activé non seulement par le glutamate mais également par le voltage membranaire. Lorsque la membrane est à l'état de repos, un ion de magnésium (Mg^{2+}) bloque le canal du récepteur. Lorsque la membrane est dépolarisée, l'ion Mg^{2+} est expulsé hors du canal ce qui permet l'influx ionique de Na^+ et de Ca^{2+} . En conséquence, l'activation des récepteurs NMDA engendre l'activation d'enzymes dépendantes du Ca^{2+} et de protéines kinases dépendantes de seconds messagers à l'intérieur du neurone postsynaptique (Kandel et Siegelbaum, 2000b). Ces réactions biochimiques sont importantes dans les voies du déclenchement de signaux de transduction de la nociception qui contribuent aux modifications de la douleur à long terme. Il est rapporté que les récepteurs NMDA sont impliqués dans les phénomènes de douleurs inflammatoire et neuropathique, tant au niveau de l'induction de la nociception que dans la persistance subséquente (Dickenson, 2004). Un antagoniste au récepteur NMDA devrait donc prévenir la sensibilisation.

2.3.2. GABA

À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière, il est rapporté qu'environ 30 à 40% de tous les neurones sont inhibiteurs (Todd et McKenzie, 1989). Les neurones inhibiteurs utilisent comme neurotransmetteur l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et certains utilisent la glycine comme co-transmetteur. La synthèse du GABA se fait à partir du glutamate par une réaction catabolique produite par l'enzyme de l'acide glutamique décarboxylase. Le GABA est le principal neurotransmetteur qui inhibe l'émission de

potentiels d'action par les neurones des mammifères. Il est retrouvé dans les interneurons des circuits locaux de la moelle épinière et aussi dans les neurones de projection à l'intérieur du cerveau (principalement dans le cervelet) (Kandel et Siegelbaum, 2000b). Les molécules de GABA se lient aux récepteurs transmembranaires ionotropiques (canaux ioniques) GABA_A et métabotropiques (couplés à une protéine G) GABA_B. Les récepteurs au GABA sont présents dans plus de 30% des neurones du système nerveux central (Neto et al., 2006). Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs GABA_A ouvrent des canaux sélectivement perméables aux ions Cl⁻. Lors du potentiel postsynaptique inhibiteur, la charge ionique intracellulaire devient négative, créant ainsi une hyperpolarisation de la cellule. Le changement de conductance produit par la liaison du GABA maintient le potentiel membranaire postsynaptique à un niveau négatif inférieur au seuil, réduisant ainsi la probabilité d'émission de potentiels d'action par le neurone postsynaptique. L'inhibition par les récepteurs GABA_B est associée à l'ouverture des canaux potassiques (K⁺). Puisque l'équilibre potentiel des ions K⁺ est toujours négatif à l'état de repos membranaire, l'entrée de K⁺ hyperpolarise et inhibe le neurone postsynaptique.

Les récepteurs au GABA sont particulièrement importants dans l'action de certaines drogues. Leur activation peut générer une dépression du SNC. Des substances agonistes aux récepteurs GABA telles que les benzodiazépines et les barbituriques, sont utilisées en clinique pour le traitement de l'épilepsie et peuvent être des substances très sédatives et des anesthésiques efficaces (Rang et al., 2007). Chez un modèle rat de douleur neuropathique, il a été démontré que la perte de ces récepteurs résulte en une douleur persistante. Il a été rapporté que la diminution de l'activité des récepteurs GABA_A à l'aide d'un antagoniste, la bicuculline, augmente le développement de la douleur chronique chez un modèle rat d'arthrose (Simjee et al., 2004). Le GABA est donc un neurotransmetteur important dans la perception de la douleur au niveau du SNC.

2.3.3. Neuropeptides

Le terme neuropeptide fait référence à plus d'une centaine de peptides qui modulent la neurotransmission du système nerveux et/ou modulent la régulation endocrinienne de systèmes cellulaires, d'où leur rôle de neuromodulateur (Hook et al., 2008). Les neuropeptides sont synthétisés et libérés par une multitude de cellules nerveuses. Chaque peptide possède une séquence d'acides aminés primaire unique qui définit ses actions biologiques propres. La biosynthèse s'initie par le codage génomique d'un précurseur des protéines (proneuropeptide) qui est synthétisé par les ribosomes et dans lequel se retrouve la séquence peptidique. Le proneuropeptide est d'une longueur d'environ 100-350 résidus et contient une séquence signal N-terminale et une région qui contient le peptide dans laquelle plusieurs copies de fragments du peptide actif peuvent se retrouver (Perone et Castro, 1997). Du réticulum endoplasmique, le proneuropeptide est transporté à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques jusqu'à l'appareil de Golgi (Figure 12). C'est dans les vésicules que surviennent les modifications du proneuropeptide telles que le clivage (fragmentation) et la glycosylation. Des enzymes protéolytiques spécifiques (protéases) fragmentent le proneuropeptide et le peptide actif est formé et prêt à être libéré hors des terminaisons nerveuses (Hook et al., 2008). Les neuropeptides sont déplacés du corps cellulaire jusqu'aux synapses par un transport axonal. La libération du contenu des vésicules dans la fente synaptique ne se fait qu'en réponse à l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} ou autre signal intracellulaire. La neurotransmission survient alors par l'activation dépendante de la présence des neuropeptides de récepteurs peptidergiques retrouvés aux niveaux pré et postsynaptiques.

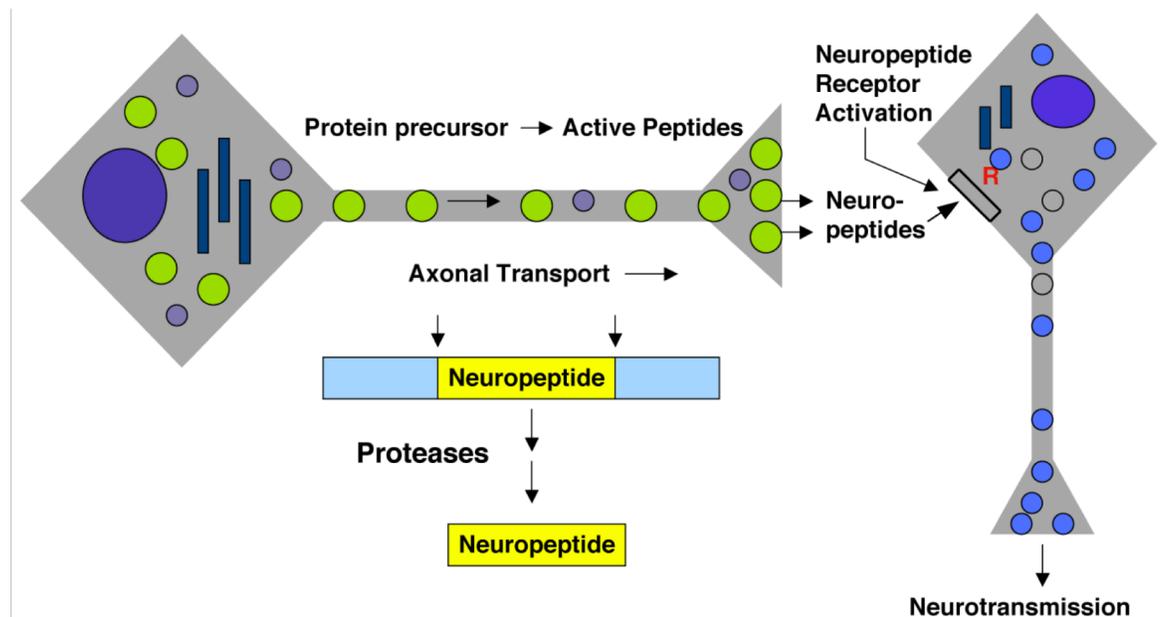


Figure 12. Schéma de l'origine des neuropeptides jusqu'au processus de neurotransmission. C'est à l'intérieur du corps cellulaire que la synthèse du précurseur de la protéine survient. Par la suite, le proneuropeptide qui est transporté à l'intérieur de vésicules (ronds verts) est dirigé par transport axonal jusqu'à la terminaison nerveuse présynaptique. C'est dans les vésicules que survient le clivage du proneuropeptide par l'action de protéases. Le neuropeptide actif est formé et prêt à être libéré par les vésicules dans la fente synaptique pour ensuite activer des récepteurs spécifiques localisés sur un autre neurone. Tirée de Hook et al., 2008.

2.3.3.1. Substance P

La substance P (SP) est un peptide qui a des actions dans le SNC et le SNP. Son nom provient du fait que cette molécule était un composé non identifié en poudre. C'est un peptide composé de 11 acides aminés qui est synthétisé dans le ganglion de la racine dorsale et produit par les modifications post-transcriptionnelles du gène préprotachykinine (TAC1). Il fait partie de la famille des tachykinines qui inclue également les neurokinines

A et B ainsi que les neuropeptides K et γ . Des études ont démontré par immunocytochimie que la SP était premièrement localisée dans les neurones du SNC et les tissus périphériques, et qu'elle était aussi présente dans certaines cellules non neuronales telles que les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires (Zubrzycka et Janecka, 2000). La SP est libérée par les terminaisons nerveuses périphériques et centrales des fibres A δ et C (Schaible et al., 2005). En périphérie, la SP est grandement impliquée dans les mécanismes de la réponse inflammatoire. Elle favorise la production d'autres substances algogènes telles que les kinines et les prostaglandines (PGs) dans les tissus avoisinants et pourrait stimuler la libération d'autres médiateurs tels que l'histamine qui sensibilisent ou excitent les nocicepteurs. Les concentrations de SP sont considérablement augmentées dans les tissus enflammés de façon chronique (Schaible et al., 2005). C'est un peptide qui favorise la vasodilatation. Il active plusieurs cellules du système immunitaire et induit l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. Son rôle dans les mécanismes de la réponse inflammatoire sera élaboré plus en détails dans la section 3.1.

Au niveau central, son rôle pronociceptif est indéniable. À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière, en réponse à l'entrée de Ca^{2+} dans la fibre afférente périphérique et au même moment que la libération vésiculaire de glutamate, des vésicules remplies de SP libèrent leur contenu dans l'espace inter-synaptique. La SP module l'information sensorielle en favorisant une dépolarisation prolongée des terminaisons nerveuses postsynaptiques (Zubrzycka et Janecka, 2000). Toutes fibres afférentes contenant de la SP sont des nocicepteurs (Todd, 2009). Celles-ci sont retrouvées dans la partie superficielle (laminae I et II) de la moelle épinière. La cible principale de la SP est le récepteur NK1 qui est lié à une protéine G, mais la SP se lie aussi aux récepteurs NK2 et NK3 mais avec beaucoup moins d'affinité. Le récepteur NK1 est exprimé en très forte densité dans la lamina I, où une estimation d'environ 45 % de la totalité des neurones qui expriment le NK1 est rapportée (Todd et al., 1998). Le NK1 est quasi absent dans la lamina II, mais il est exprimé par certains neurones dans les laminae plus profondes III, IV et V (Littlewood et al., 1995). Ce récepteur est internalisé dans les neurones de la corne dorsale

lorsqu'il est activé par la SP suite à une stimulation nociceptive en périphérie (Todd, 2009). Lors de conditions normales, seuls des stimuli nociceptifs engendrent l'internalisation du récepteur dans les neurones de la lamina I. Lors de conditions pathophysiologiques telles que l'inflammation et des lésions nerveuses, l'internalisation du NK1 survient suite à des stimuli non douloureux et est observée dans les laminae profondes de la corne dorsale. De plus, les effets de la SP sur la nociception dépendent de sa concentration. En forte concentration, la SP induit une accentuation de la réponse douloureuse, expliquée par ses actions pré et postsynaptiques qui stimulent la transmission neuronale à l'intérieur des voies de la douleur. En faible concentration, il est rapporté que la SP stimule la sécrétion de peptides opioïdes endogènes (Zubrzycka et Janecka, 2000). Cette libération de SP peut être inhibée par ces peptides opioïdes endogènes.

2.3.3.2. Peptide lié au gène codant pour la calcitonine

Le peptide lié au gène codant pour la calcitonine (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP) est un produit du processus alternatif du gène codant pour la calcitonine. Ce peptide d'une longueur de 37 acides aminés active les enzymes adénylate cyclase (AC) et phosphokinase A (PKA) par son activation de récepteurs spécifiques couplés à une protéine G. Le CGRP est impliqué dans les mécanismes périphériques et spinaux de la douleur. Ce peptide est co-localisé avec la SP dans les fibres afférentes. Lors du processus inflammatoire, le CGRP agit de façon synergique avec la SP comme peptide pro-inflammatoire et pronocicepteur. En périphérie, il participe à la promotion de l'activation des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. C'est un peptide vasodilatateur qui, par un mécanisme indépendant des cellules endothéliales, est aussi un relaxant des muscles lisses vasculaires. Par ailleurs, il a également un rôle anti-inflammatoire. Le CGRP est capable d'inhiber l'œdème et certaines actions inflammatoires causées par l'histamine, la 5-HT et les cellules inflammatoires (Raud et al., 1991). Au niveau central, le CGRP amplifie les effets des acides aminés excitateurs tel que le glutamate (Ebersberger et al., 2000) et accentue la libération de SP par les fibres afférentes (Oku et al., 1987). Il produit ainsi une dépolarisation postsynaptique lente et accentue l'excitabilité des neurones de la corne

dorsale. Une étude a démontré que l'application iontophorétique du CGRP près des neurones de la moelle épinière ayant un influx provenant des fibres afférentes du genou cause une augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones (Neugebauer et al., 1996). De plus, cette même étude rapporte que l'hyper-réceptivité des neurones peut être bloquée par des molécules antagonistes sélectives au CGRP. Le CGRP joue un rôle important dans la neurotransmission centrale de l'information nociceptive qui provient de l'articulation du genou (McDougall, 2006a).

2.3.3.3. *Opiïdes endogènes*

Les interneurons et les neurones de la moelle épinière utilisent, en plus du GABA, des molécules opioïdes endogènes comme neurotransmetteurs afin de moduler la nociception (Sandkuhler, 2009). La transmission et l'amplification de l'information nociceptive sont modulées aussi par des neurotransmetteurs qui produisent des effets analgésiques similaires à la morphine: les opioïdes endogènes. Leur nom provient du fait qu'ils interagissent avec les mêmes récepteurs que ceux activés par l'opium. Les précurseurs protéiniques de ces peptides opioïdes codant pour l'enképhaline, les dynorphines, la β -endorphine et la nociceptine (ou orphanine FQ (N/FQ)) sont la préproenképhaline, la préprodynorphine, la proopiomélanocortine et la préproN/FQ respectivement (Chauvin et Beaulieu, 2005).

Les peptides opioïdes agissent sur quatre types de récepteurs opioïdes : μ , δ , κ et ORL1 (*Opioid Receptor Like 1*). Dans les centres supérieurs, les récepteurs μ et κ ont été localisés de façon prédominante dans le NRM. Dans la région SGPA et dans le *nucleus locus coeruleus*, les agonistes des récepteurs opioïdes produisent l'analgésie en désinhibant les fibres descendantes par l'inhibition de l'influx neuronal gabaergique. Cela module en conséquence d'autres voies descendantes telles que les neurones noradrénergiques afin de produire l'analgésie. Les récepteurs opioïdes sont également localisés dans le SNP, et en grande quantité au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière sur les neurones venant de la périphérie. Une étude a démontré par marquage immunohistochimique la présence

préférentielle des opioïdes endogènes dans la moelle épinière (Marvizon et al., 2009). L'anticorps spécifique à la β -endorphine a démontré sa localisation principalement dans les neurones de la corne ventrale de la moelle. L'anticorps de l'enképhaline a marqué la voie dorsolatérale de la corne dorsale ainsi que les laminae I-III et V. Les anticorps spécifiques à la dynorphine ont marqués des fibres localisées principalement dans les laminae I, II et V de la corne dorsale. Ainsi, les opioïdes endogènes peuvent produire une inhibition des voies de la douleur au niveau central. Au niveau postsynaptique, ils permettent l'ouverture des canaux potassiques ce qui entraîne une hyperpolarisation cellulaire et une inhibition de potentiels d'action excitateurs. De plus, ils inhibent l'activité de l'adénylate cyclase, ce qui réduit le contenu intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC). Au niveau présynaptique, ils inhibent l'ouverture des Ca_v ce qui a pour conséquence de diminuer la libération de neurotransmetteurs pronociceptifs et pro-inflammatoires tels que le glutamate, la SP et le CGRP à partir des terminaisons nerveuses des neurones périphériques. Bref, ils produisent une réduction de l'excitabilité neuronale (Kapitzke et al., 2005). D'ailleurs, il a été démontré par immunoréactivité que la dynorphine est co-localisée avec la SP et le CGRP dans les fibres C peptidergiques, et partiellement avec la présence de vésicules remplies de glutamate (Marvizon et al., 2009) (Figure 13).

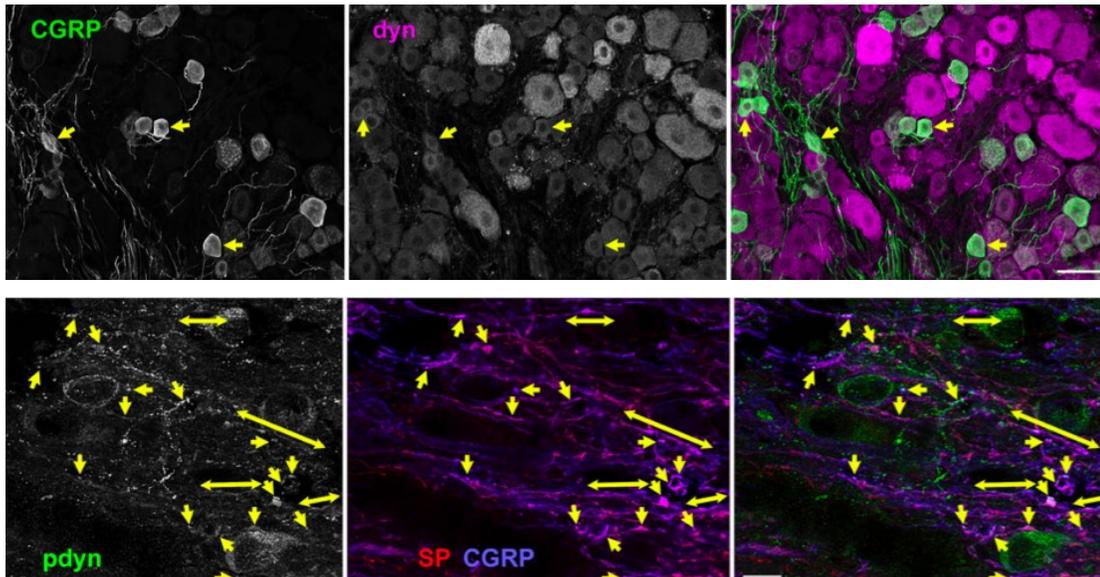


Figure 13. Co-localisation des neuropeptides à l'intérieur des fibres afférentes primaires retrouvées dans la corne dorsale chez le rat. Les trois images de la rangée du haut illustrent par marquage immunocytochimique la co-localisation du CGRP et de la dynorphine à l'intérieur d'un ganglion de la racine dorsale. Les flèches indiquent l'immunoréactivité des cellules pour le CGRP et la dynorphine. Les trois images de la rangée du bas illustrent la présence de CGRP, de SP et de la prodynorphine dans les terminaisons nerveuses libres des fibres afférentes primaires à l'intérieur de la moelle épinière (L1-L3). Échelle de mesure : 10 μ m. Tirée de Marvizon et al., 2009.

2.3.3.3.1. Dynorphines

Suite à l'activité des protéases sur la prodynorphine, des peptides dérivés sont produits dans diverses régions du SNC incluant le cortex cérébral et la moelle épinière (Merg et al., 2006). Un fragment protéolytique de la prodynorphine se nomme la *Big dynorphin* (Big Dyn₁₋₃₂) qui est constitué de 32 résidus aminés et comprend les peptides dérivés dynorphine A₁₋₁₇ (dynA) et dynorphine B₂₀₋₃₂ (dynB) (Merg et al., 2006). L'implication de la dynA₁₋₁₇ et de son fragment de 13 acides aminés (dynA₁₋₁₃) est la plus

rapportée dans la littérature lors des mécanismes de la douleur. Le système impliquant les dynorphines n'est pas encore parfaitement élucidé et certains paradoxes sont rapportés pour le rôle spécifique de ce système dans les mécanismes de la nociception. Cette famille d'opioïdes endogènes devrait théoriquement induire une activité analgésique comme le font les enképhalines et les endorphines. Cependant, des résultats contradictoires sont rapportés concernant ses propriétés fonctionnelles.

La dynA se retrouve en quantité très abondante dans le SNC et est très sélective pour les récepteurs κ (Merg et al., 2006). Dans la littérature, il est établi que les concentrations de dynA à l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière sont augmentées en situations pathologiques neurologiques (Kajander et al., 1990; Malan et al., 2000) ou inflammatoires (Parra et al., 2002; Ruda et al., 1988). Peu d'études ont rapporté les effets antinociceptifs de la dynA. Il a été démontré *in vitro* que l'activation des récepteurs κ par la dynA dans les ganglions de la corne dorsale de cellules de souris inhibait l'activité des canaux Ca_v (Werz et Macdonald, 1985). L'inhibition de la transmission synaptique des nocicepteurs en présence de dynA a été observée à l'aide d'enregistrements intracellulaires de neurones de la substance gélatineuse de la moelle épinière (Randic et al., 1995). De plus, il est rapporté que la dynA peut inhiber la libération de la SP à l'intérieur de la moelle du rat lors de l'activation mécanique des nocicepteurs périphériques (Zachariou et Goldstein, 1997).

D'autres études rapportent le rôle pronociceptif des dynorphines au niveau central. Des études ont démontré qu'une administration intrathécale de dynA produit des effets pronociceptifs qui n'impliqueraient pas les récepteurs κ , mais plutôt les récepteurs NMDA (Malan et al., 2000; Massardier et Hunt, 1989; Shukla et Lemaire, 1994). De plus, il a été démontré que la dynA induit un influx calcique via les canaux Ca_v indépendamment du mécanisme impliquant les récepteurs NMDA (Tang et al., 2000) et que cet influx est généré par l'activation des récepteurs à la bradykinine (Lai et al., 2006). La concentration élevée de dynA dans la moelle épinière lors de conditions pathologiques pourrait donc maintenir la

sensibilisation centrale et participer ainsi au mécanisme de douleur chronique (Wang et al., 2001).

Les dynorphines possèdent une séquence N-terminale qui est essentielle pour la liaison efficace avec les récepteurs κ (Merg et al., 2006). Dépendamment du site de fragmentation, un peptide dérivé de la prodynorphine peut ne pas posséder cette séquence. Cette différence structurale peut expliquer l'interaction variable rapportée des dynorphines à des récepteurs distincts et leur action pharmacologique résultante. Il est aussi suggéré qu'à des concentrations physiologiques, le système comprenant les dynorphines serait antinociceptif via les récepteurs opioïdes, alors qu'à des concentrations pathophysiologiques élevées, il serait pronociceptif agissant sur les récepteurs NMDA (Hauser et al., 1999). Les effets antinociceptifs ou pronociceptifs des dynorphines pourraient donc dépendre de l'interaction avec les récepteurs opioïdes, NMDA et les récepteurs à la bradykinine, tout comme des concentrations retrouvées au site d'action du peptide.

Il est à noter qu'une variété de neuropeptides est impliquée dans les mécanismes de la douleur mais n'est pas élaborée dans cette thèse. L'univers des neuropeptides au niveau central, mais aussi en périphérie, reste à ce jour peu élucidé lors de mécanismes pathologiques.

2.3.4. Récepteurs vanilloïdes

D'autres molécules endogènes sont critiques pour détecter les signaux nociceptifs des neurones sensoriels. La spécificité des nocicepteurs est établie par l'expression de canaux ioniques et de récepteurs qui sont activés seulement par des stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques à des seuils élevés (Woolf et Ma, 2007). En plus des Ca_v et des Na_v , d'autres protéines transmembranaires permettent aux nocicepteurs d'encoder et de transmettre l'information nociceptive.

Les récepteurs vanilloïdes font partie de la famille des récepteurs caractérisés par leur potentiel transitoire d'activation (*transient receptor potential*, TRP), d'où leur appellation commune désignée par TRPV (*transient receptor potential vanilloid*). Ces récepteurs sont des canaux cationiques qui laissent entrer les ions Ca^{2+} et Na^+ . Dans la famille des vanilloïdes, certains récepteurs sont activés par des stimuli de chaleur (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4), alors que d'autres sont activés par des stimuli de froid (TRPM8, TRPA1) (Schaible et Radbruch, 2006). Alors que la sensibilité tactile et les fonctions motrices se détériorent dans le froid, la perception de la douleur persiste. Le récepteur TRPM8 et le TRPA1 possèdent un domaine C-terminal différent par rapport aux autres récepteurs TRP. Ces récepteurs détectent le froid intense qui donne la sensation de brûlure (Woolf et Ma, 2007). Les récepteurs TRP sont exprimés principalement dans les neurones périphériques. Les propriétés thermiques distinctes de leur seuil d'excitation ne sont pas fixes et semblent changer lors de réactions inflammatoires. Cela contribue au développement de l'hypersensibilité au froid ou à la chaleur. Les antagonistes des récepteurs TRPV peuvent être une approche à considérer afin de réduire la douleur inflammatoire (Woolf et Ma, 2007).

2.3.4.1. Récepteur TRPV1

Le TRPV1 est couplé à un canal ionique qui est activé par des ions H^+ , la chaleur ($> 43^\circ\text{C}$), un pH extracellulaire faible (4.0-5.0), des médiateurs lipidiques ou encore par des vanilloïdes exogènes telles que la résiférotaxine et la capsaïcine. D'ailleurs, le TRPV1 est aussi connu sous le nom de récepteur de la capsaïcine (Caterina et al., 1999). Le TRPV1 est synthétisé dans les ganglions de la corne dorsale de la moelle épinière et est exprimé par environ 40 % des fibres nerveuses de la racine dorsale (Schaible et al., 2005). Il est aussi identifié à l'intérieur des ganglions trijumeaux. Il est aussi exprimé dans les terminaisons nerveuses spinales et périphériques (Pedersen et al., 2005) ainsi qu'à l'intérieur de différents types de cellules non nerveuses, c'est-à-dire les cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes) et des tissus périphériques (Ma et Quirion, 2007). Le TRPV1 est exprimé dans plusieurs régions du cerveau indiquant ainsi qu'il est impliqué dans une

variété de fonctions (neuroprotection, sécrétion d'acide gastrique) et non seulement dans le processus de la douleur (Westaway, 2007).

Le TRPV1 possède un rôle important dans l'activation des nocicepteurs polymodaux. Des études ont démontré l'évidence de l'implication de ce récepteur lors de la sensation de la douleur (Fernihough et al., 2004; Szallasi et Blumberg, 1996). En utilisant des modèles animaux de douleur, il a été démontré que l'expression du TRPV1 est diminuée dans les fibres nerveuses endommagées, alors qu'elle est augmentée dans les fibres proximales au site de la lésion (Westaway, 2007). L'utilisation de souris déficientes du TRPV1 a démontré que ce canal ionique est essentiel lors de la sensibilisation thermique (Schaible et Radbruch, 2006). Par ailleurs, la force de courant ionique extracellulaire augmentée par la réponse à des stimuli douloureux est abolie chez des souris déficientes du TRPV1, ce qui propose que le TRPV1 est sensibilisé par des concentrations extracellulaires élevées de Na^+ , de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (Pedersen et al., 2005). L'activation de ce récepteur est initiée par une dépolarisation cellulaire dépendante du voltage. Une brève stimulation du TRPV1 induit une élévation prolongée de Ca^{2+} présynaptique ainsi qu'une augmentation conséquente de libération de glutamate au niveau de la synapse (Medvedeva et al., 2008). L'activité du récepteur TRPV1 est modifiée par une phosphorylation réversible et rapide par la phosphokinase C qui engendre une excitation, ou l'effet inverse, du nocicepteur (Pedersen et al., 2005). De plus, les interactions entre d'autres médiateurs de l'inflammation et le récepteur sont d'importants mécanismes appuyant son activité dans le processus de l'inflammation. Ma et al. (2007) rapportent l'activité augmentée du récepteur par des neurotransmetteurs (glutamate, 5-HT, ATP, histamine, PGs) et par des peptides de la douleur (bradykinine, prokinéticine (PK1 et PK2) qui sont libérés en réponse aux dommages tissulaires. À l'aide de la méthode de RT-PCR, il a été démontré que le TRPV1 est exprimé dans les fibroblastes de la membrane synoviale chez un modèle rat d'arthrose (Engler et al., 2007), confirmant ainsi son rôle actif lors de la douleur articulaire. De plus, des ligands antagonistes des récepteurs TRPV1 sont présentement étudiés pour leur

potentiel de traitement analgésique et anti-inflammatoire (Honore et al., 2005; Puttfarcken et al., 2010).

3. Pathophysiologie de l'arthrose

3.1. Réponse inflammatoire (sensibilisation) périphérique

L'inflammation est plus que le produit d'une réponse du système immunitaire. Elle est aussi contrôlée par les systèmes nerveux et endocrinien. Même si l'inflammation n'est pas la caractéristique principale de la pathologie de l'arthrose, à l'inverse de l'arthrite rhumatoïde, elle constitue un événement clé dans le phénomène de douleur. Lors d'une lésion articulaire suite à un traumatisme ou une dégénérescence des tissus, une cascade d'événements fait partie de la réponse inflammatoire. L'inflammation peut être aiguë et persister jusqu'à devenir chronique. La réponse inflammatoire aiguë engendre un mécanisme de réparation tissulaire. Ces signes cliniques sont de la rougeur, de l'enflure, de la chaleur et de la douleur (Kindt et al., 2007). Il peut aussi survenir une perte de mobilité de l'articulation lésée. La réponse inflammatoire est divisée en deux phases. La phase immunitaire innée est activée immédiatement après la blessure et est caractérisée par la reconnaissance d'un organisme envahissant. La seconde phase, la réponse immunitaire adaptée fait suite à la phase innée. Elle comprend des réponses spécifiques qui amplifient l'action des cellules et des médiateurs de la phase innée.

Lors d'une lésion articulaire, une vasodilatation apparaît en quelques minutes suite à une élévation du volume sanguin dans la région de la lésion. La vasodilatation est induite par des médiateurs tels que l'histamine, les PGs et la bradykinine qui sont produits par l'interaction d'enzymes et de protéines tissulaires. La bradykinine retrouvée au site de la lésion est une des substances chimiques les plus algogènes rapportées jusqu'à ce jour (Coutaux et al., 2005). Cette augmentation du volume sanguin réchauffe le tissu et cause la caractéristique de rougeur. De plus, la perméabilité vasculaire s'accroît et engendre des

fuites de protéines plasmatiques du liquide venant des vaisseaux sanguins (extravasation). Cela engendre l'accumulation de liquide (œdème) qui enflé l'articulation et étire la membrane synoviale. La réponse inflammatoire implique la participation de plusieurs types de cellules. Les cellules endothéliales, les mastocytes et les macrophages tissulaires sont présents dans les tissus en situation normale, alors que les plaquettes et les leucocytes (neutrophiles, monocytes et macrophages) ont accès au site d'inflammation par la circulation sanguine. Les lymphocytes (T et *natural killer cells*, NK), les éosinophiles et les neurones sont aussi impliqués dans la réponse inflammatoire.

Les neutrophiles sont les premières cellules leucocytaires à arriver au site de l'inflammation. Elles adhèrent aux cellules épithéliales dans la région enflammée par extravasation à l'aide de cellules d'adhésion, les sélectines et les intégrines. Ce processus permet aux neutrophiles de migrer au travers des parois des capillaires afin de se retrouver dans l'espace extravasculaire. Les neutrophiles sont attirés vers le site de lésion par chimiotaxisme, stimulus induit par les chimiokines. Les neutrophiles à présent dans les tissus lésés initient le processus de digestion des micro-organismes (phagocytose). Les neutrophiles tuent les micro-organismes, en partie en générant des produits oxydatifs toxiques telle que l'enzyme oxyde nitrique synthétase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) qui a des effets pro-inflammatoires (Kindt et al., 2007). Plusieurs heures après, les monocytes arrivent au site d'inflammation par un processus de migration similaire à celui des neutrophiles. Dans les tissus, les monocytes se différencient en macrophages. Les macrophages libèrent des cytokines qui agissent sur les cellules endothéliales.

Les cytokines, avec la bradykinine, peuvent expliquer le lien entre les dommages tissulaires et la réponse inflammatoire (Coutaux et al., 2005). La famille des cytokines inclue les interférons, les interleukines (IL), les facteurs de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*, TNF), les facteurs de croissance (*growth factor*, GF) les chimiokines et les facteurs de stimulation de colonie (*colony-stimulating factor*, CSF) (Kindt et al., 2007). Certaines cytokines inhibent les aspects de la réponse inflammatoire tels que le facteur de croissance tumoral- β (TGF- β) et les IL-4, IL-10 et IL-13. Ces cytokines inhibent la

production de chimiokines. Il existe aussi des cytokines qui amplifient l'inflammation en induisant la formation et la libération d'autres médiateurs inflammatoires. L'interleukine-1 (IL-1, principalement IL-1 β), IL-6, IL-8 et le TNF- α sont les principales. Ces cytokines libèrent l'enzyme cyclo-oxygénase 2 (COX-2) lorsqu'elles sont activées. La liaison de l'enzyme COX-2 et de l'acide arachidonique libérée par la phosphokinase A₂ près de la membrane cellulaire produit des prostaglandines (Fletcher, 2005). Les prostaglandines font partie de la famille des eicosanoïdes qui inclue aussi les thromboxanes et les leukotriènes générées pas des précurseurs phospholipidiques. Lors de l'inflammation articulaire, la libération de prostaglandines de type E-2 (PGE₂) prédomine. La PGE₂ est un puissant vasodilatateur qui agit en synergie avec l'histamine et la bradykinine (Rang et al., 2007). Elles sont capables d'activer des récepteurs de la nociception, ce qui leur donne un rôle de médiateurs dans la transduction de l'influx nocicepteur. Les effets cataboliques et pro-inflammatoires de l'IL-1 β et du TNF- α sont générés par l'activation de diverses voies de signalisation. La plus importante est celle du facteur nucléaire κ B (*nuclear factor* κ B, NF κ B) (Kapoor et al., 2011). Le NF κ B génère l'expression de plusieurs gènes codant pour l'inflammation tels que ceux codant pour la iNOS, la COX-2 et les chimiokines, et contribue à l'induction des metalloprotéinases (MMP) 1, 9 et 13 ainsi que celle avec le motif de type 1 de thrombospondine 4 (*a desintegrin-like and metalloproteinase with a thrombospondin domain*, ADAMTS-4) qui dégradent la matrice extracellulaire (Roman-Blas et Jimenez, 2006).

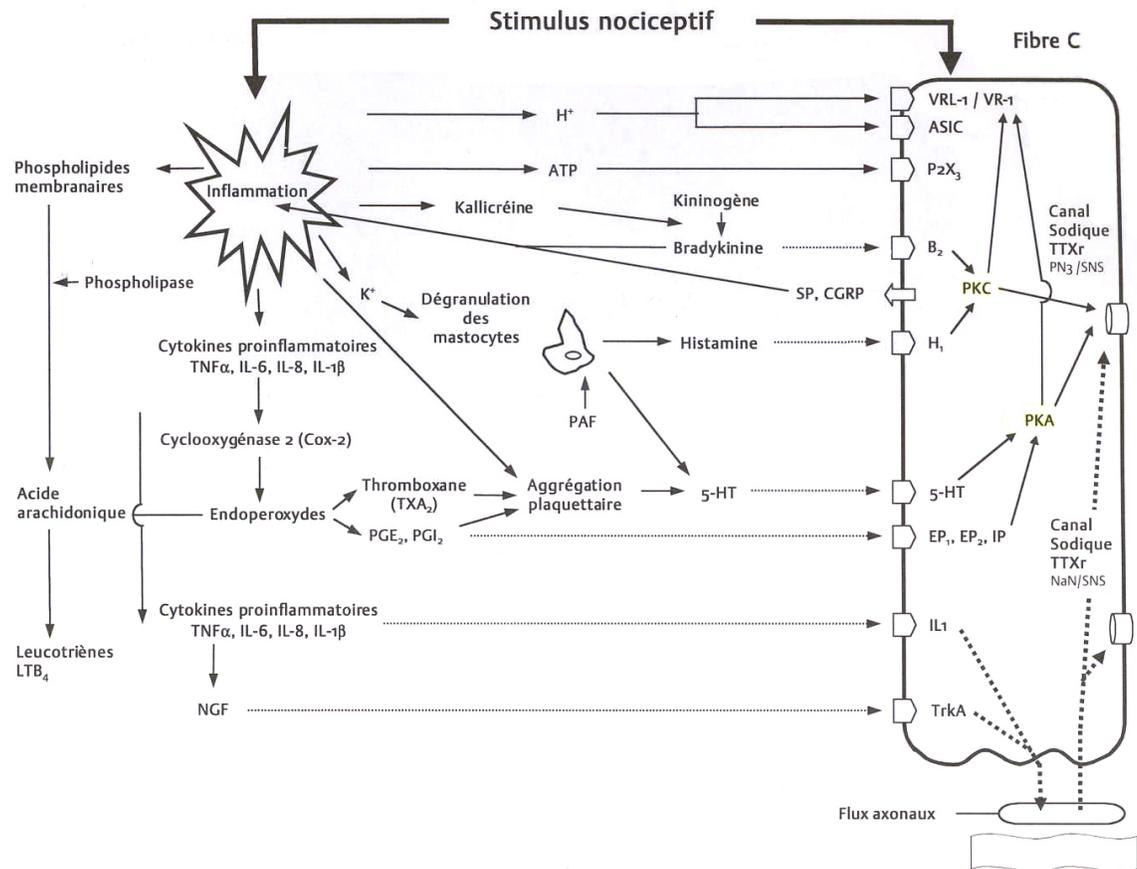


Figure 14. Schéma montrant les mécanismes moléculaires produits lors de la réponse inflammatoire suite à une lésion tissulaire en périphérie. Des médiateurs périphériques de l'inflammation retrouvés au site de la lésion vont soit stimuler ou sensibiliser les nocicepteurs. Ces médiateurs sont produits par des cellules du système immunitaire ou libérés par les fibres sensorielles. Ces médiateurs phosphorylent et activent des récepteurs et des canaux ioniques impliqués dans la transduction et la conduction de l'influx nociceptif. Suite à une sensibilisation post-transcriptionnelle, de nouveaux canaux et récepteurs sont produits, amplifiant ainsi la réactivité des nocicepteurs. Tirée de Fletcher, 2005.

Les médiateurs périphériques de l'inflammation peuvent induire le phénomène d'hyperalgésie suite au recrutement des nocicepteurs avoisinant le site de la lésion.

L'hyperalgésie se définit comme une accentuation de la sensibilité au site de la lésion et de la réactivité à la stimulation de la zone qui entoure les tissus endommagés. Les mécanismes périphériques impliqués dans ce phénomène génèrent de l'hyperalgésie qui est dite primaire. Des stimuli habituellement ressentis comme légèrement douloureux ou normalement indolores sont ressentis comme douloureux (Marchand, 2005). La lésion et la douleur s'entremêlent ainsi dans une cascade complexe de signaux locaux. Lors de la réponse inflammatoire, des médiateurs chimiques sont générés et agissent sur des récepteurs et des canaux ioniques localisés sur la membrane des nocicepteurs C et A δ . L'activation des récepteurs induit la transduction de l'influx nociceptif, c'est-à-dire qu'ils sont capables de convertir le stimulus en courant dépolarisant qui traverse la membrane cellulaire (Coutaux et al., 2005). L'activation des canaux ioniques induit la conduction de cet influx (Fletcher, 2005). Des ions d'hydrogène (H⁺) et de l'adénosine triphosphate (ATP) sont libérés par les tissus endommagés. Les ions H⁺ interagissent avec les canaux ioniques sensibles à l'acide (*acid-sensitive ionic channels*, ASICs). Ces canaux s'activent lorsque le pH s'abaisse à moins de 6.9. Il est rapporté qu'au site d'inflammation, le pH tissulaire peut s'abaisser jusqu'à une valeur de 5.5. Les ions H⁺ sensibilisent également les récepteurs TRPV1. L'activation des récepteurs ASICs et TRPV1, ainsi que de l'ATP sur le récepteur P2X₃ engendre l'ouverture des canaux cationiques, ce qui dépolarise la terminaison nerveuse de la fibre. De plus, la 5-HT libérée lors de l'agglomération des plaquettes et de la dégranulation des mastocytes au site de l'inflammation sensibilise certains récepteurs à d'autres facteurs. La 5-HT, tout comme l'histamine, se lie à des récepteurs spécifiques et induit la phosphorylation de protéines kinases (PKA et PKC) qui augmentent l'efficacité des canaux sodiques résistants à la tétrodotoxine (TTXr) et diminuent le seuil d'activation des récepteurs tel que le TRPV1 (Coutaux et al., 2005). De plus, le complexe impliquant la liaison des facteurs de croissance des nerfs (*nerve growth factors*, NGFs) avec les récepteurs à la tyrosine kinase A (TrkA) induit des changements au niveau de la synthèse protéique incluant l'augmentation des facteurs de transcription pour la production des TTXr, SP et de CGRP (Coutaux et al., 2005). Lors de l'inflammation articulaire, des

concentrations augmentées de NGFs sont observées dans le liquide synovial ainsi que dans les nerfs innervant les tissus enflammés (Woolf et al., 1994).

3.1.1. Inflammation neurogène

La sensibilisation de la fibre afférente induit la production amplifiée de nouveaux canaux et récepteurs suite à une sensibilisation post-transcriptionnelle. Cette sensibilisation induit la libération de neuropeptides immunomodulateurs (SP, neurokinine A (NKA) et CGRP) par un réflexe axonal antidromique (McQueen, 1999). Ces neuropeptides causent l'inflammation neurogène (Schaible et al., 2005). L'amplification des messages nociceptifs est produite non seulement par les médiateurs chimiques libérés au site de l'inflammation, mais aussi par le recrutement de fibres adjacentes sensibilisées et activées via le réflexe axonal. La SP, la NKA et le CGRP sont des peptides vasodilatateurs qui agissent directement sur les cellules musculaires lisses et indirectement sur les mastocytes, qui à leur tour libèrent de l'histamine et d'autres médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α , eicosanoïdes, oxyde nitrique (*nitric oxide*, NO)) (Handy, 1999; Kidd et al., 1990). Ainsi, la SP pourrait produire la stimulation de cytokines pro-inflammatoires. Une étude a démontré *in vitro* que des concentrations pathophysiologiques de SP augmentaient la production de TNF- α , IL-1 β , IL-2 et IL-6 par les leucocytes (Delgado et al., 2003). Ce peptide influence les fonctions des monocytes et des neutrophiles (Lotz et al., 1988; Nakagawa et al., 1995) et accentue la migration des éosinophiles (El-Shazly et al., 1996). Il est aussi rapporté que la SP module la fonction des lymphocytes en stimulant la prolifération des lymphocytes T et la synthèse d'immunoglobulines (Payan et Goetzl, 1985). Le rôle le plus rapporté pour la SP est sa capacité d'amplifier la réponse immunitaire innée. La SP augmente la perméabilité vasculaire, alors que le CGRP est reconnu en tant que puissant vasodilatateur (McGillis et Fernandez, 1999). En réponse à un stimulus nociceptif, la libération de SP et de CGRP au site de la lésion augmente l'œdème en causant une vasodilatation et en augmentant la porosité de la barrière endothéliale. Il est rapporté qu'en plus de stimuli nociceptifs, les médiateurs pro-inflammatoires tel que l'IL-1 peuvent causer la libération de SP et de CGRP des terminaisons nerveuses des nocicepteurs (Herbert et Holzer, 1994). Une

étude a démontré qu'en détruisant les nocicepteurs contenant la SP et le CGRP en périphérie, une diminution de l'enflure est observée chez les animaux ayant reçu une injection intra-articulaire d'un adjuvant induisant l'arthrite. Pour ces mêmes animaux, le seuil de tolérance à la douleur était augmenté (Cruwys et al., 1995).

Pendant le processus inflammatoire, l'expression des récepteurs opioïdes est accrue et le transport axonal des récepteurs opioïdes à partir du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents est augmenté. Les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement par des cellules immunitaires et être analgésiques (Chauvin et Beaulieu, 2005). Lorsqu'activés par les ligands opioïdes, les récepteurs opioïdes situés sur les cellules immunitaires peuvent supprimer l'activité de lymphocytes et inhiber la synthèse ou la libération de cytokines. Par contre, au niveau périphérique, le rôle pronociceptif de la dynA dans le processus inflammatoire a été rapporté (Sydbom et Terenius, 1985). Chez le rat, la dynorphine induit la libération d'histamine par les mastocytes de façon dépendante de la dose. Une autre étude suggère que la dynorphine induit une extravasation plasmique (Chahl et Chahl, 1986).

3.2. Sensibilisation centrale

L'hyperalgésie secondaire est présente lorsque l'origine de la douleur provient des mécanismes centraux. Marchand (2005) explique que l'hyperalgésie secondaire est davantage connue sous le terme de sensibilisation centrale. La sensibilisation des fibres afférentes en périphérie par l'inflammation accroît les influx nociceptifs au niveau central. Ces influx activent les neurones centraux et, dans certains cas, les sensibilisent. Des neurones nociceptifs spécifiques de types C et A δ qui reçoivent les influx de l'articulation lésée démontrent une augmentation significative de leurs réponses suite aux stimulations de pression douloureuse engendrées par l'inflammation en périphérie. Leur seuil d'activation à présent diminué fait en sorte qu'ils deviennent activés par des stimuli non douloureux appliqués à l'articulation, phénomène appelé l'allodynie. Ce phénomène fait référence à

l'apparition de douleur suite à un stimulus, qui normalement se trouve sous le seuil douloureux (Basbaum et Jessell, 2000). De plus, des neurones de projection non nociceptifs spécifiques (à large gamme dynamique) de types C, A δ et A β démontrent une augmentation de leur réponse aux stimuli non douloureux et douloureux (Marchand, 2005). Cette augmentation de stimulation des neurones innervant l'articulation du genou a pour conséquence d'élargir le champ récepteur qui répond de façon spécifique aux stimulations nociceptives. Il peut ainsi apparaître une perception de douleur ailleurs que dans l'articulation lésée. Ce phénomène se nomme l'allodynie secondaire. Les mécanismes de sensibilisation centrale comportent divers complexes biochimiques tels que l'augmentation de la libération intra-spinale de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs ainsi que l'excitabilité accrue de neurones postsynaptiques.

L'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison présynaptique du neurone venant de la périphérie induit une entrée d'ions Ca²⁺ dans la fibre. Cette augmentation intracellulaire de calcium engendre l'exocytose de vésicules remplies de neuromédiateurs tels que la SP, le CGRP, le glutamate et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF). Ces peptides sont libérés par les terminaisons centrales des fibres C et ont un effet excitateur sur les neurones de la moelle en agissant sur des récepteurs spécifiques; le récepteur NK1 pour la SP, le récepteur spécifique au CGRP (CGRPr) pour le CGRP, les récepteurs NMDA-AMPA et mGLUr pour le glutamate et le récepteur TrkB pour le BDNF. Ces liaisons induisent à leur tour une entrée d'ions Ca²⁺ dans le neurone postsynaptique et activent des seconds messagers tels que la COX-2 et la iNOS. Sur la membrane du neurone postsynaptique, la phosphorylation de certains récepteurs active des seconds messagers qui activent une variété de voies intracellulaires, incluant les voies des protéines kinases PKA et PKC.

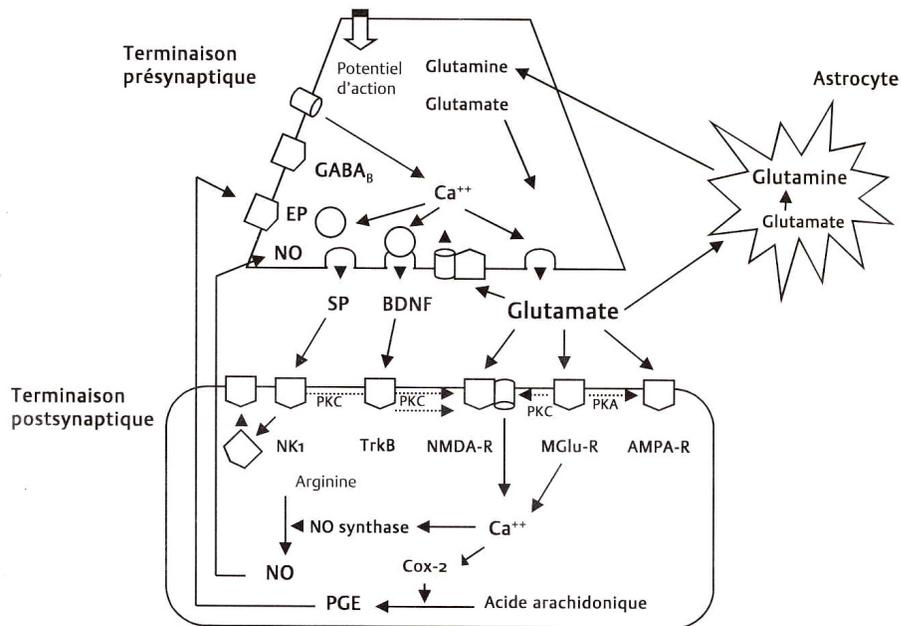


Figure 15. Schéma illustrant les médiateurs de la corne dorsale de la moelle épinière. L'arrivée du potentiel d'action à la terminaison présynaptique de la fibre sensorielle provoque une entrée d'ions Ca^{2+} qui engendre une exocytose de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs dans la fente synaptique. Ces médiateurs agissent sur des récepteurs spécifiques retrouvés sur le neurone postsynaptique et induisent l'entrée d'ions Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique tout en activant des seconds messagers. Certains médiateurs activent la phosphorylation de récepteurs par l'entremise de protéines kinases. Des événements postsynaptiques peuvent générer à nouveau une activité présynaptique par la libération de médiateurs qui activent des récepteurs localisés sur la terminaison présynaptique. Tirée de Fletcher, 2005.

La présence de cytokines pro-inflammatoires à l'intérieur de la moelle a été observée. Les effets de longue durée des cytokines IL-6 et TNF- α lors d'une sensibilité mécanique articulaire suggèrent que ce sont des molécules clés dans la sensibilisation

centrale (Schaible, 2009). Il a été démontré par immunohistochimie l'évidence d'une augmentation des concentrations de cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α à l'intérieur de la moelle épinière suite à une lésion des nerfs périphériques (DeLeo et Colburn, 1999). Une constriction chronique d'un nerf périphérique induit une infiltration de lymphocytes T auxiliaire de type 1 (*T-Helper*, Th) (Moalem et al., 2004). Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires. Une voie de la sensibilisation centrale induite par les cytokines implique les récepteurs vanilloïdes (Obreja et al., 2002). Lorsque le niveau de TNF augmente dans la moelle, la proportion de neurones qui exprime le TRPV1, via le récepteur spécifique au TNF (TNFr1), augmente également (Hensellek et al., 2007). Le TNF- α aurait donc un rôle important dans la production de l'hyperalgésie thermique par une augmentation de la synthèse des récepteurs TRPV1 (Schaible, 2009). Une autre voie de la sensibilisation centrale implique que les cytokines pro-inflammatoires activent la production de PGE₂ dans le SNC en activant l'enzyme COX-2 et participent à la sensibilisation centrale (Samad et al., 2001). La production centrale accrue de PGE₂ augmente la synthèse des récepteurs spécifiques aux PGs. Ces récepteurs se retrouvent sur le neurone présynaptique et sur le neurone postsynaptique. Au niveau postsynaptique, les PGE₂ retrouvées dans la terminaison neuronale agissent sur des protéines kinases et favorisent l'activation de récepteurs (NMDA, mGLUR) et canaux ioniques (Ca²⁺) par ces kinases. Par leur augmentation de Ca²⁺ dans le neurone postsynaptique, les PGE₂ activent de façon indirecte l'enzyme iNOS. La formation de NO agit comme neurotransmetteur rétrograde en activant la libération de glutamate par les neurones présynaptiques (Handy, 1999). L'activation des récepteurs spécifiques aux PGs sur la membrane cellulaire présynaptique augmente aussi la quantité de médiateurs libérés dans la fente synaptique. Les PGE₂ produites dans la moelle épinière agissent aussi sur les interneurons ayant pour médiateur le GABA en inhibant leur activation.

Suite à une blessure tissulaire, le recrutement à haute fréquence et répété des fibres C provoque une augmentation du nombre de potentiels d'actions des fibres de la moelle. Cela crée une sensibilisation des neurones postsynaptiques induite par l'activation

constante et répétée des récepteurs NMDA de façon directe par le glutamate, et de façon indirecte par la SP et le CGRP. L'augmentation de la fréquence de décharge des fibres C est définie comme le phénomène de « *windup* » (Marchand, 2005). Le *windup* contribue à une sensibilisation des neurones nociceptifs des cornes dorsales de la moelle (Li et al., 1999). C'est un phénomène passager et d'une durée relativement courte. Cependant, si la sensibilisation perdure, un autre mécanisme nociceptif est mis en place. Une stimulation prolongée des récepteurs NMDA produit une sensibilisation cellulaire de longue durée (*long term potentiation*, LTP) en activant des gènes à expression rapide qui code les facteurs de transcription tels que les *c-fos*. Cela produit une hyperalgésie qui peut persister suite à la résorption de la blessure tissulaire. Selon Dickenson (2004), les neurones profonds de la corne dorsale ont une réponse de type *windup* à des stimuli douloureux répétitifs, alors que les fibres de la lamina I n'en ont pas. Il est important de ne pas confondre le phénomène de *windup* avec celui de la sensibilisation centrale malgré les multiples similarités. La sensibilisation centrale se réfère à l'accroissement de l'excitation des neurones de la corne dorsale et se caractérise par l'augmentation de l'activité neuronale, donc un champ récepteur élargi, par les réponses évoquées des fibres C et A. L'étude de Li et al. (1999) a démontré à l'aide de stimulation électrique que le *windup* ne change en rien la réponse des fibres A. Ils en concluent que le phénomène de *windup* n'est pas suffisant pour produire l'ensemble des caractéristiques de la sensibilisation centrale et induire la chronicité de la douleur.

3.3. Catégories fonctionnelles de la douleur

La douleur est le symptôme prédominant chez les patients atteints d'arthrose et représente le déterminant principal d'incapacité chez les gens atteints d'arthrose (Woolf et Pfleger, 2003). Lorsqu'un stimulus douloureux est appliqué sur un tissu normal, une douleur physiologique aiguë est ressentie. Le rôle premier de cette réaction physiologique est de protéger le tissu et de le prévenir afin d'éviter qu'il ne soit endommagé davantage.

La douleur nociceptive pathologique (somatique ou viscérale) survient lorsque le tissu est endommagé. Cette douleur peut survenir spontanément (en l'absence d'une stimulation intentionnelle) et/ou par l'hyperalgésie et/ou l'allodynie.

3.3.1. Douleur inflammatoire

La douleur inflammatoire est une douleur dite spontanée. Lors de l'inflammation, l'hyperalgésie se caractérise par l'apparition de douleur émanant d'un stimulus normalement non douloureux (un mouvement simple de l'articulation dans son axe mécanique ou une palpation légère de l'articulation) et par une intensité accrue de la douleur lorsque l'articulation effectue une hyper-rotation ou une hyperextension. Les nerfs peuvent être impliqués, ce qui engendre une douleur dite neuropathique.

3.3.2. Douleur neuropathique

Alors que la douleur nociceptive est une conséquence d'une stimulation douloureuse au niveau des terminaisons nerveuses dans le tissu, la douleur neuropathique quant à elle est le résultat d'une blessure ou d'une pathologie des neurones du SNP ou du SNC. Cette douleur est ressentie comme une sensation de brûlure, peut être persistante et peut survenir lors d'épisodes de courte durée. Elle peut être combinée à de l'hyperalgésie ou de l'allodynie. La douleur neuropathique se caractérise par une apparition soudaine de douleur qualifiée comme un choc électrique. Elle peut être engendrée par un mouvement ou survenir spontanément. Cette douleur se propage habituellement le long du territoire innervé par le nerf atteint. L'inflammation locale d'un nerf périphérique joue un rôle crucial dans l'apparition de la douleur neuropathique (Schaible et al., 2006). Cette particularité de la douleur peut être la cause de la douleur diffuse ressentie par un patient atteint d'arthrose.

3.3.3. Douleur chronique

Dans la littérature, la douleur chronique est caractérisée par sa durée; soit plus de six mois (Turk et Okifuji, 2001). Or, de plus en plus, la douleur chronique est définie par ses

caractéristiques propres. Elle consiste en une irritation des terminaisons des fibres ou des circuits nociceptifs ayant pour conséquence une activité anormale interprétée comme douloureuse. Ce type de douleur peut être consécutive à une maladie chronique. Dans ce cas, elle peut découler de la persistance du processus de nociception. La douleur chronique peut être accompagnée d'une dérégulation endocrinienne, de la fatigue et peut jouer un rôle majeur sur les performances mentales. Un grand aspect psychologique est associé à ce type de douleur. Dickenson (2004) associe le phénomène de douleur chronique à l'influx de stimuli répétitifs à transmission synaptique de haute fréquence, ce qui engendre une multitude de potentiels d'action. Cette potentialité de longue durée des synapses des neurones afférents de type C est importante pour le développement et le maintien de l'hyperalgésie. Une douleur persistante n'a pas uniquement comme origine une augmentation des afférences nociceptives. Elle peut aussi être le résultat d'une baisse de l'inhibition ou d'une augmentation de l'excitation centrale. L'information douloureuse étant modulée dès son entrée dans la moelle et à tous les niveaux du SNC, il est probable qu'un dérèglement des mécanismes de contrôle de la douleur soit la source de certaines douleurs chroniques (Marchand, 2005).

3.4. Anormalités des structures articulaires

L'arthrose n'est pas une pathologie impliquant seulement le cartilage articulaire. Tous les tissus de l'articulation en sont affectés : l'os sous-chondral, la membrane synoviale, les ménisques, les ligaments, les muscles péri-articulaires et les fibres nerveuses afférentes qui ont leurs terminaisons nerveuses à l'intérieur et à l'extérieur de la capsule articulaire (Brandt, 2002) (Figure 15). Les changements pathophysiologiques sont attribués à un réseau complexe formé de facteurs biochimiques qui engendre une perturbation de l'équilibre entre la réparation et la dégradation tissulaire (Fernandes et al., 2002; Myers et al., 1990).

Certains changements physiques surviennent dans les tissus articulaires lorsque le phénomène d'arthrose s'installe. Ces changements incluent la dégradation protéolytique graduelle de la matrice du cartilage articulaire associée à une augmentation de la synthèse de ses composantes par les chondrocytes (Dieppe et Lohmander, 2005). Ces événements ont pour conséquence l'apparition de changements morphologiques au niveau du cartilage qui ont des répercussions sur d'autres tissus articulaires. Les premiers stades de l'arthrose sont caractérisés par un œdème à l'intérieur de la membrane synoviale (Pritzker, 2003). Alors que le liquide de l'œdème se résorbe, la quantité de protéoglycanes augmente. L'inflammation de la membrane synoviale contribue à la dérégulation de la fonction des chondrocytes du cartilage par la production de cellules pro-inflammatoires et des protéases (Goldring et Goldring, 2007). Ce phénomène provoque un épanchement intra-articulaire qui modifie l'aspect visuel de l'articulation (Laadhar et al., 2007).

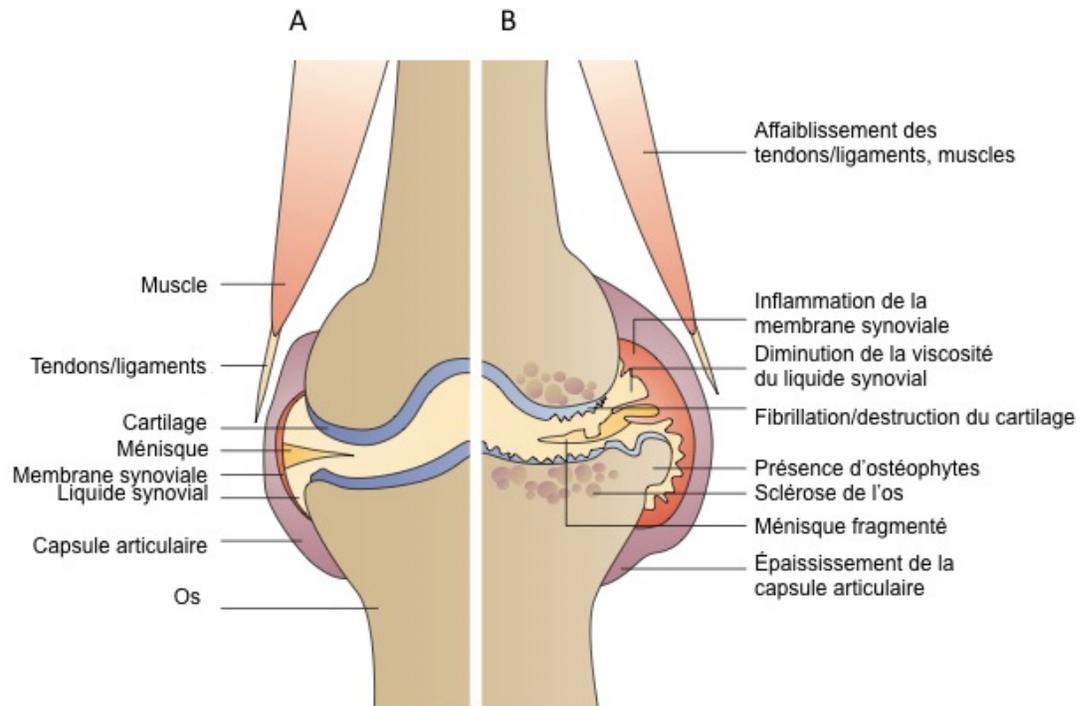


Figure 16. Les structures articulaires impliquées lors de l'arthrose et leurs modifications structurales. L'articulation normale du genou humain comporte un cartilage sans fissure et sans signe d'inflammation de la membrane synoviale (A). Le processus dégénératif de l'arthrose implique des modifications structurales au niveau du cartilage, de la membrane synoviale et de la capsule articulaire (B). Modifiée de Wieland et al., 2005.

Les changements pathophysiologiques les plus documentés dans la littérature portent sur le cartilage articulaire. Chez les animaux et les humains atteints d'arthrose, les premiers changements perçus au niveau du cartilage articulaire du genou démontrent une réaction hypertrophique et une augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire et du nombre de protéoglycanes dans les couches médiane et profonde du cartilage. Survient ensuite une déplétion des principales composantes de la matrice. Finalement, des dommages sévères sont observés au cartilage, principalement dans la couche superficielle

où il y a une perte de fibres de collagène de type II. La dégénérescence du cartilage articulaire liée à l'arthrose apparaît d'abord à la surface du cartilage sous forme de fibrillation. Le cartilage devient fissuré accompagné d'une diminution du nombre de chondrocytes. Par la suite, les fissures cartilagineuses initialement parallèles à la surface articulaire pénètrent de façon verticale dans le cartilage endommagé pour éventuellement atteindre l'os sous-chondral (Pritzker, 2003). À ce stade avancé d'arthrose, la fibrillation laisse place à l'érosion du cartilage. Le dérèglement du comportement des chondrocytes s'installe progressivement, favorisant un déséquilibre de leurs activités cataboliques et anaboliques dans le remodelage des composantes de la matrice extracellulaire (Goldring et Goldring, 2007). Ces modifications vont peu à peu diminuer les capacités de résistance du cartilage aux forces auxquelles il est soumis provoquant ainsi un amincissement des couches du cartilage, et éventuellement sa disparition (Laadhar et al., 2007).

La dégénérescence du cartilage articulaire est précédée d'un épaissement de l'os sous-chondral (Hulejova et al., 2007). La prolifération osseuse engendre un remodelage de l'interface du cartilage calcifié laissant place à une vascularisation à l'intérieur du cartilage. Éventuellement, des pointes granuleuses apparaissent à la surface articulaire. Le développement de calcifications osseuses retrouvées aux marges de l'os (ostéophytes) survient suite à une ossification du cartilage. La formation d'ostéophytes, processus endochondral, débute à la périphérie du cartilage articulaire où il y a apparition de petites bosses osseuses recouvertes de cartilage (Pritzker, 2003) (Figure 17). Il en résulte une déformation osseuse qui engendre un mauvais alignement de l'articulation. Cette déformation osseuse est une tentative de compensation de la part de l'articulation pour les anomalies biomécaniques en modifiant la forme de l'articulation (Dieppe, 1999). La progression de l'arthrose démontre la formation de kystes à l'intérieur de l'os sous-chondral.

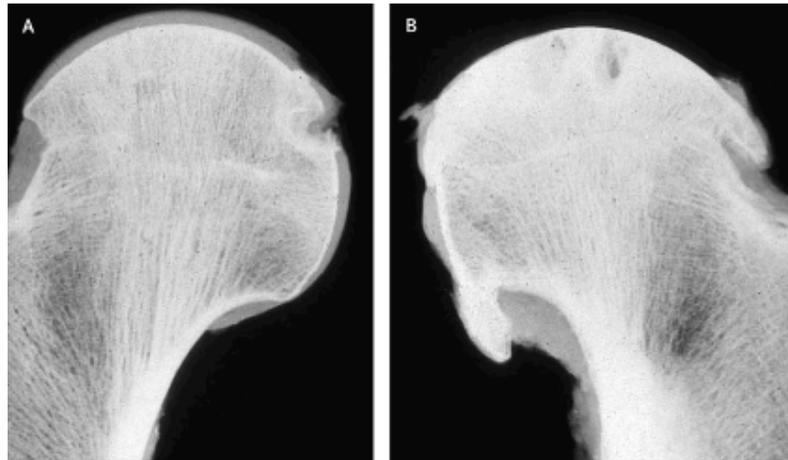


Figure 17. Radiographie de la tête fémorale humaine d'un genou sain (A) et d'un genou atteint d'arthrose (B) démontrant la présence d'ostéophytes aux extrémités de l'os, d'un changement de la forme de l'os, de kystes à l'intérieur de l'os sous-chondral. Tirée de Dieppe et al., 2005.

3.5. Causes de douleur articulaire

Le cartilage est dépourvu de fibres nerveuses, ce qui suggère qu'aucune douleur ne peut être générée par ce tissu. Cependant, l'absence de cartilage ainsi que des dommages et des débris cartilagineux génèrent indirectement de la douleur. Des fragments de cartilage endommagé retrouvés libres dans la cavité synoviale stimulent la réponse inflammatoire de la membrane synoviale, tout comme d'autres matériaux libérés par le cartilage (collagène, protéoglycanes, enzymes protéolytiques, cytokines) (Lozada et Altman, 2005). Une étude récente a identifié une corrélation entre des marqueurs biologiques de changements dans la matrice extracellulaire et la douleur chez des patients atteints d'arthrose au niveau du genou (Ishijima et al., 2011). Les protéines C2C et CTX-II retrouvées respectivement dans le sérum et dans l'urine, sont des marqueurs de dégradation du collagène cartilagineux. Ils sont retrouvés en plus grande quantité chez les patients ressentant de la douleur en

comparaison aux patients qui n'en ressentent pas. Une étude conduite par Torres et al. (2006) suggère que la gravité de la douleur au niveau du genou est associée à différents facteurs : un épanchement du liquide synovial, un épaissement de la membrane synoviale, l'usure de l'os sous-chondral, une lésion de la moelle osseuse, ainsi que des déchirures au niveau des ménisques. La douleur n'est pas associée à une subluxation méniscale (Torres et al., 2006). Présente seulement dans le tiers distal (loin des forces de compression), l'innervation des ménisques fait en sorte que ces structures génèrent de façon indirecte de la douleur (Lozada et Altman, 2005).

L'os sous-chondral, le périoste, la membrane synoviale, les ligaments et la capsule articulaire sont des structures articulaires très innervées par les fibres sensorielles. Des modifications structurales de ces tissus articulaires par le processus inflammatoire et le processus de dégénérescence tissulaire activent les fibres sensorielles afférentes. Par le fait même, ces structures représentent des sources potentielles de douleur reliée à l'arthrose (Dieppe et Lohmander, 2005; Kidd, 2006). Ceci peut être confirmé par plusieurs études qui ont rapporté la présence de fibres A δ et C par la méthode de coloration d'immunoréactivité spécifique pour les neuropeptides SP et CGRP (Elfvin et al., 1998; Gronblad et al., 1988; Konttinen et al., 1989). De plus, par sa fonction de transporteur et de réservoir de produits inflammatoires, le liquide synovial cause indirectement de la douleur. Il dilate la capsule articulaire et peut compresser des vaisseaux sanguins, activant ainsi les mécanorécepteurs et les nocicepteurs retrouvés dans la capsule articulaire (Lozada et Altman, 2005).

Des lésions au niveau de la moelle osseuse peuvent refléter de l'hypertension intra-osseuse due à un faible drainage osseux. Il est suggéré que cette pression osseuse augmentée est secondaire à une obstruction veineuse (Arnoldi et al., 1975). La présence d'un œdème dans la moelle osseuse peut également être une des causes de douleur dans le genou chez des sujets atteints d'arthrose (Felson, 2005). La douleur osseuse serait causée par l'augmentation de la pression sur l'os chez le patient atteint d'arthrose. Les lésions au niveau de la moelle osseuse démontrent des évidences d'une augmentation d'eau, de sang et d'autres fluides à l'intérieur de l'os.

D'autres sources potentielles de douleur telle que l'ulcération osseuse sont identifiées (Poole et al., 2007). Il a été démontré que la croissance d'ostéophytes aux marges de l'articulation participe de façon importante à la douleur lors de l'arthrose primaire (Dieppe, 1999) et serait expliquée par la dilatation du périoste par les ostéophytes (Lozada et Altman, 2005). La concentration de la protéine NTX, un biomarqueur de la résorption osseuse, est significativement augmentée dans l'urine de patients ressentant de la douleur en comparaison aux concentrations chez des patients sans douleur (Ishijima et al., 2011). Donc, la contribution de la structure osseuse lors du processus de douleur associée à l'arthrose est indéniable.

La prévalence de la douleur associée à la dégénérescence articulaire varie selon l'articulation atteinte et une variation inter individus est à prendre en considération (Buckwalter et Martin, 2006). De plus, le degré de douleur perçue par un individu est lié à l'étendue de la stimulation de la surface tissulaire. Plus la surface est grande, plus le nombre de fibres nerveuses sollicitées sera élevé. Cela dit, la sommation spatiale a des répercussions sur le nombre de nocicepteurs recrutés, ce qui peut avoir pour effet, si la surface est importante, de multiplier les afférences nociceptives vers le SNC. Selon Dickenson (2004), le degré et la zone de douleur sont amplifiés par l'activation des récepteurs NMDA.

3.5.1. Biomécanique de l'articulation du genou atteinte d'arthrose

L'articulation du genou est une jonction entre des segments osseux qui permet un mouvement ainsi que le transfert de forces d'un os à l'autre (Herzog et al., 2009). Les forces externes (gravité, inertie et les forces de contact) ont une grande influence sur la mécanique de l'articulation. Les forces internes agissent sur les structures articulaires telles que le cartilage, les ligaments, les muscles, les tendons et les ménisques. En plus de la douleur associée à l'inflammation qui limite la mobilité ainsi que l'application de charge (masse corporelle) sur l'articulation lésée, la perte du cartilage, un mauvais alignement des surfaces articulaires, la présence d'ostéophytes, une contraction excessive des muscles

entourant l'articulation ou encore une atrophie de ces muscles sont tous des aspects pathologiques de l'arthrose qui affectent le fonctionnement normal de l'articulation. Ils peuvent engendrer une laxité articulaire, un affaiblissement de la proprioception et l'apparition de douleur (Sharma, 2004). Ces limitations fonctionnelles provoquent des incapacités chez les gens et les animaux. Il est rapporté que les variations au niveau de l'épaisseur du cartilage articulaire dans le processus dégénératif de la pathologie sont associées aux modifications du support de la charge. Un patron de marche modifié induit un décalage substantiel de la zone de contact vers une zone structurelle non adaptée à supporter une charge. La friction entre les surfaces de contact augmente suite à la fibrillation du cartilage articulaire, et la force tangentielle qui est transmise par la surface de contact augmente également. Suite aux changements dégénératifs des tissus, la force de cisaillement augmente entre les surfaces articulaires et la force de compression aussi puisqu'elle en dépend (Andriacchi et al., 2004). En diminuant la force de compression, il est possible de minimiser le recrutement des nocicepteurs à l'intérieur de l'articulation et ainsi diminuer la perception de douleur. De plus, des mouvements de flexion/extension de petites amplitudes ainsi que de légères rotations effectuées par l'articulation du genou atteinte d'arthrose engendrent un stress énorme sur les terminaisons libres des axones des nocicepteurs (McDougall, 2006b). Lors de l'exécution d'un mouvement par l'articulation lésée, l'influx nerveux des fibres afférentes est amplifié démesurément. Généralement, les sujets minimisent l'amplitude de mouvement de l'articulation, ce qui engendre une difficulté à se déplacer et/ou à monter les marches d'un escalier. Tant chez l'humain que chez les animaux, les mesures standards pour évaluer les modifications mécaniques de l'articulation associées à l'arthrose sont : l'évaluation de la force externe appliquée lors du contact au sol à l'aide de plateformes de force, l'électromyographie pour la quantification des forces musculaires, les patrons de distribution de la charge entre les membres et l'analyse de la démarche par une évaluation du patron de la démarche. Il a été démontré que des changements dans le patron de la démarche influencent grandement l'initiation et/ou la progression de l'arthrose au niveau du genou (Andriacchi et al., 2009).

3.5.1.1. Patron de marche normal

Chez les quadrupèdes digitigrades et les bipèdes plantigrades, le cycle de marche est composé des mêmes phases. La phase d'appui, lors de laquelle le membre est en contact avec la surface, comprend environ 62 % du cycle total de marche. La phase d'oscillation, lors de laquelle le membre est surélevé et ne fait aucun contact avec une surface, compte pour environ 38 % du cycle de marche complet (Chambers et Sutherland, 2002; Charteris et al., 1979). La phase d'appui peut être à son tour divisée en plusieurs périodes : l'absorption, le support de la charge et la propulsion.

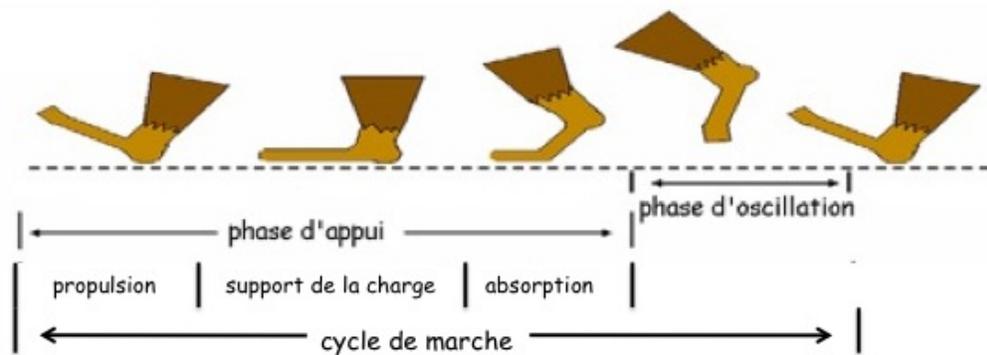


Figure 18. Représentation schématique d'une patte démontrant les phases et les différentes périodes de la phase d'appui composant un cycle de marche. Modifiée de Vincelette et al. 2007.

Chez les quadrupèdes digitigrades, la période d'absorption débute par le contact des coussins métatarsiens et métacarpiens. Ensuite, la charge est graduellement transférée sur les coussins digitaux. Un mouvement rapide caudal de l'humérus survient et est associé à une flexion du grasset et du jarret (Charteris et al., 1979). Chez les bipèdes, l'os calcanéum (talon) reçoit la force d'impact et supporte la charge lors du contact initial avec la surface. Par la suite, la charge est transférée au reste de la patte. Chez l'humain, une flexion du

genou est observée au même moment que le talon fait contact avec le sol (Allard et Blanchi, 2000). C'est à ce moment de la phase d'appui que la charge au niveau du genou est à son maximum (Schipplein et Andriacchi, 1991). Alors que chez l'homme, le genou est la composante anatomique la plus absorbante lors de la phase d'appui, le grasset des quadrupèdes absorbe beaucoup moins la charge puisque celle-ci est atténuée en partie par le jarret (Charteris et al., 1979). De plus, l'absorption en phase d'appui implique les membres antérieurs (thoraciques) qui atténuent grandement la force d'impact des membres postérieurs (pelviens).

Lors de la période de support de la charge chez les quadrupèdes, une extension du jarret et un mouvement caudal continu limité du fémur sont observés. L'amplitude de mouvement du grasset est limitée. Chez le bipède, l'articulation du genou effectue une extension, mais conserve une flexion d'environ 15°. Ceci permet d'augmenter la longueur de foulée, ce qui représente un mécanisme important dans la conservation d'énergie (Saunders et al., 1953). Lors de la période de propulsion, les mécanismes de propulsion sont accomplis par l'action synergique des groupes musculaires gastrocnémiens, quadriceps et ischio-jambiers. C'est à la fin de la phase d'appui que l'hyperextension de la cuisse atteint son maximum pour être graduellement renversée. Le genou en extension effectue graduellement une flexion, et conserve cette position tout au long de la phase d'oscillation. Dans la phase de propulsion, le grasset des quadrupèdes démontre une amplitude d'extension limitée alors que le fémur continue son mouvement caudal. Une flexion mineure du grasset est nécessaire pour élever la patte de la surface d'appui pour le début de la phase d'oscillation.

La phase d'oscillation est semblable chez les quadrupèdes et les bipèdes. C'est la phase du cycle de marche qui nécessite le moins d'énergie. L'action des muscles entourant l'articulation contrevient à la force externe (gravité). La flexion du membre en oscillation réduit le moment d'inertie et permet une protraction efficace du membre lors la période de propulsion (Charteris et al., 1979).

Tout changement dans la cinématique de l'articulation peut causer un décalage des régions articulaires qui supportent la charge normalement vers des régions qui n'ont pas la capacité de s'adapter à ce support de charge soudain. Il s'ensuit des modifications biologiques, morphologiques et fonctionnelles (Andriacchi et al., 2004).

3.5.1.2. Patron de marche pathologique

La démarche des animaux et des humains atteints d'arthrose du genou se caractérise par une boiterie consécutive à la douleur ressentie. Cela permet de diminuer la charge appliquée sur l'articulation lors de la phase d'appui (Andriacchi et al., 2004). Une boiterie engendre inévitablement des modifications dans chacune des phases du cycle de marche. Certains paramètres de la démarche indiquant un déficit fonctionnel de l'articulation ont été rapportés dans le patron de marche de rats atteints d'arthrite unilatérale (Vincelette et al., 2007). Dans leur étude, Vincelette et ses collègues rapportent une diminution de la durée du cycle de marche complet, de la phase d'appui et de la période d'absorption pour le membre lésé. En évitant de supporter la charge sur le membre lésé, des rats atteints d'arthrose ont démontré une phase d'oscillation plus longue que celle de rats contrôles (Simjee et al., 2007). Une autre étude a démontré une diminution de la force de réaction au sol tout au long du patron de marche chez le chat ayant développé de l'arthrose suite à une rupture ligamentaire (Suter et al., 1998). Cette diminution est une stratégie d'adaptation afin d'éviter le déplacement excessif du tibia lors de la phase initiale de la phase d'appui.

La douleur articulaire a également pour conséquence de réduire l'amplitude de mouvement de l'articulation. Les patients atteints d'arthrose au niveau du genou démontrent une réduction de la flexion de l'articulation lors de la phase d'oscillation, ce qui limite l'amplitude de mouvement (Holla et al., 2011). Puisque l'articulation perd de son amplitude, il en résulte une diminution de la longueur de foulée et de la vitesse de déplacement, tant chez les bipèdes (Asthephen et al., 2008) que chez les quadrupèdes (Simjee et al., 2007). Chez les quadrupèdes, l'angle du grasset est similaire lors de la marche et du trot, alors que l'amplitude de mouvement augmente lors du galop (Wisleder et

al., 1990). La variable angulaire est donc reliée à la vitesse de déplacement. Chez l'humain, l'augmentation du moment d'adduction du genou lors de la phase d'appui est une variable grandement étudiée lors d'études *in vivo* (Maly et al., 2008). Ce changement influence la distribution de la charge sur les surfaces médiale et latérale du tibia, principalement sur le plateau médial (Minns, 2005). Plusieurs autres modèles animaux d'arthrose ont démontré que la progression de la pathologie est associée à des changements de support de la charge de l'articulation (Brandt et al., 1991). Tout changement temporel ou spatial observé dans le patron de marche chez les animaux pathologiques suggère l'évitement de toute stimulation mécanique de l'articulation induite par l'exécution du cycle de marche, qui normalement serait non douloureuse (Coulthard et al., 2003).

3.6. Traitements

Le développement d'un traitement doit prendre en considération que les signes et les symptômes varient selon l'articulation atteinte et selon le stade de progression de la pathologie (Lozada et Altman, 2005). Lorsque la pathologie est déjà présente, les thérapies sont dirigées vers les symptômes tels que la douleur, l'instabilité et la faiblesse articulaire et la diminution de la fonction de l'articulation. Toutefois, le programme d'intervention le plus efficace reste toujours la prévention. Dans un premier temps, il sera conseillé aux patients obèses une perte de poids afin de diminuer la charge sur l'articulation lésée (Minor, 2004). Un programme d'exercice peut être prescrit afin de renforcer la musculature qui supporte l'articulation (Thomas et al., 2002). Il a été démontré que des programmes d'exercice peuvent réduire la douleur et améliorer la fonction de l'articulation (Fisher et al., 1991). De plus, il n'y a aucun avantage à immobiliser une articulation lors de douleur chronique (Waddell, 1987). Des accessoires de support tels que la canne, la marchette ou les béquilles à appui anté-brachial (béquilles canadiennes), peuvent aussi être prescrits. Ces accessoires permettent d'alléger le support de la charge par l'articulation, d'agrandir la base de support et d'améliorer certains symptômes comme la perte d'équilibre et la douleur.

Un lavage arthroscopique par injection intra-articulaire d'eau saline a démontré une efficacité chez certains patients pour le soulagement de la douleur (Livesley et al., 1991), mais son utilisation reste controversée (Gibson et al., 1992). Lorsque la qualité de vie est grandement réduite et qu'aucune solution ne permet de réduire la perception de la douleur, l'approche chirurgicale peut être prescrite comme option de dernier recours. La raison principale d'exécution d'une chirurgie orthopédique est la douleur intolérable continue (Lozada et Altman, 2005). Ces interventions incluent entre autres le débridement de tissus libres retrouvés dans l'articulation (arthroscopie), une redistribution des forces dans l'articulation (ostéotomie) et le remplacement de structures articulaires (arthroplastie).

Les interventions pharmacologiques ont des effets grandement appréciés par la population atteinte d'arthrose. Elles se divisent en deux classes distinctes selon leurs objectifs; celles qui modifient les symptômes associés à la pathologie (*symptom modifying osteoarthritis drugs*, SMOADs) et celles qui modifient la pathologie (*disease modifying osteoarthritis drugs*, DMOADs). Ces derniers agents pharmacologiques sont espérés avoir des propriétés de prévention, d'arrêt et de renversement du processus de l'arthrose et ne seront pas discutés dans cette thèse. La raison principale d'un traitement pharmacologique chez les sujets atteints d'arthrose reste toujours jusqu'à ce jour la recherche d'une analgésie locale afin de diminuer et de contrôler la douleur accompagnée de moins d'effets secondaires possibles (Bradley, 2004).

3.6.1. Agents analgésiques

3.6.1.1. Acétaminophène

Le premier choix de traitement pharmacologique recommandé par le Collège des rhumatologues américains (*American College of Rheumatology*, ACR) est l'acétaminophène (paracétamol, Tylenol®). Son efficacité a été démontrée, tout comme l'absence de contre-indications et d'interactions médicamenteuses ainsi que la sécurité qui

y est associée pour un traitement à long terme. L'avantage de cet agent est son coût minime et sa disponibilité en vente libre.

Puisque les effets analgésiques et antipyrétiques de l'acétaminophène sont similaires à l'aspirine, l'archétype des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), son activité minimale comme inhibiteur de l'enzyme COX a souvent été étudiée et l'effet minimal sur l'activité des COXs qui est rapporté, quel que soit l'isoforme de l'enzyme, démontre que l'acétaminophène est un agent analgésique et non anti-inflammatoire (Bradley, 2004; Rang et al., 2007). L'acétaminophène pénètre rapidement le SNC et ses actions se font par l'entremise de l'activation de la voie sérotoninergique du contrôle inhibiteur de la douleur (Tjolsen et al., 1991). Il est aussi rapporté que ces effets analgésiques centraux impliquent les voies opioïdes endogènes (Raffa et al., 2000). Tout comme l'aspirine, l'acétaminophène démontre une courbe dose-réponse linéaire qui atteint un plateau vers les 1000 mg (Cooper, 1981). Chez l'humain, la dose maximale recommandée est de 4000 mg/jour pris en plusieurs petites doses. L'acétaminophène est suggérée être un traitement efficace pour une sévérité de la douleur articulaire faible à modérée, mais a aussi démontré une efficacité chez des patients atteints d'arthrose du genou accompagnée de douleur modérée à sévère (Bradley et al., 2001). Il reste néanmoins une controverse entourant ce traitement pharmacologique pour l'arthrose. Des études épidémiologiques ont rapporté que la prise d'acétaminophène chronique pouvait engendrer une insuffisance rénale aiguë, et qu'une surdose initierait une nécrose hépatique (Bradley, 2004; Lozada et Altman, 2005).

3.6.1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les AINS sont les analgésiques les plus communs pour traiter la douleur reliée à l'arthrose. Ils ont démontré une efficacité supérieure à l'acétaminophène pour le soulagement de la douleur modérée à sévère chez des patients atteints d'arthrose du genou (Pincus et al., 2001). Ils agissent principalement en périphérie mais ont des effets substantiels au niveau de la moelle épinière et du cerveau dépendamment de leur lipophilicité (Bradley, 2004). Le mécanisme d'action le plus rapporté des AINS est la

capacité d'inhiber l'enzyme COX et ainsi réduire la douleur en éliminant la production de PGs par son action oxydative de l'acide arachidonique. La présence de COX, tant en périphérie qu'au niveau central, permet des actions analgésiques des AINS en diminuant la sensibilisation des nocicepteurs induite indirectement par les PGs (Rang et al., 2007). Les AINS classiques sont de petites molécules hydrophobes qui ont une configuration structurale leur permettant une pénétration non spécifique dans le canal hydrophobe de la COX-1 et la COX-2 (Fletcher, 2005). Ils inhibent la synthèse des PGs en bloquant de façon non sélective l'isoforme constitutive de la COX exprimée (COX-1) et l'isoforme induite (COX-2), ou de façon sélective la COX-2 (Neogi et Scholz, 2009). La COX-1 est exprimée dans divers tissus (rein, plaquette, tube digestif) alors que la COX-2 n'est pas exprimée normalement par divers tissus. Son expression est augmentée dans les tissus inflammatoires et le SNC par l'apparition de l'inflammation et par certaines tumeurs bénignes ou malignes. La COX-2 peut aussi être retrouvée dans le tube digestif, le cerveau et les reins (Abramson, 2004; Fletcher, 2005). L'homologie structurale entre la COX-1 et la COX-2 est de 60 % avec un site spécifique de fixation de l'acide arachidonique (Fletcher, 2005). La différence structurale principale des deux isoformes est la présence d'une poche latérale hydrophilique dans la COX-2 qui s'associe au canal hydrophobique présent dans les deux types de COX. C'est dans cette poche latérale que se fixe les inhibiteurs sélectifs de la COX-2, les coxibs. Lors de douleur inflammatoire, les AINS jouent un rôle significatif dans la diminution de la vasodilatation, de l'œdème et de la douleur (Rang et al., 2007).

Les AINS classiques, qui ne sont pas sélectifs à la COX-2, sont l'aspirine (acide salicylique), le diclofénac (Arthrotec®), l'ibuprofène (Advil® et Motrin®), le kétoprofène (Orudis®, Rhodis® et Rhovail®), le naproxène (Naprosyn®), l'indométacine (Rhodacine®), le méloxicam (Mobicox®) et la peroxicam (Feldène®). Certains sont des agents peu dispendieux et disponibles en vente libre, mais des effets secondaires associés à une prise continue de ces traitements sont grandement rapportés (Bradley, 2004). Des symptômes gastro-intestinaux tels que des ulcères et des saignements dus au rôle important des PGs dans la protection cytogastrique et dans l'agrégation plaquettaire ont été rapportés

(Rang et al., 2007). Chez certains patients, ce traitement peut aussi causer une insuffisance rénale par l'inhibition de la biosynthèse des PGs impliquées dans le maintien de la circulation sanguine rénale (Rang et al., 2007). De plus, un effet de plateau est rapporté suite à une administration prolongée. Il n'est pas clair si cette perte d'efficacité est liée à un changement pharmacodynamique (effets produits par le médicament sur l'organisme) ou à l'atténuation de l'effet placebo suite à la prise de médicament (Bradley, 2004). Souvent, une prescription d'autres analgésiques est nécessaire par la suite.

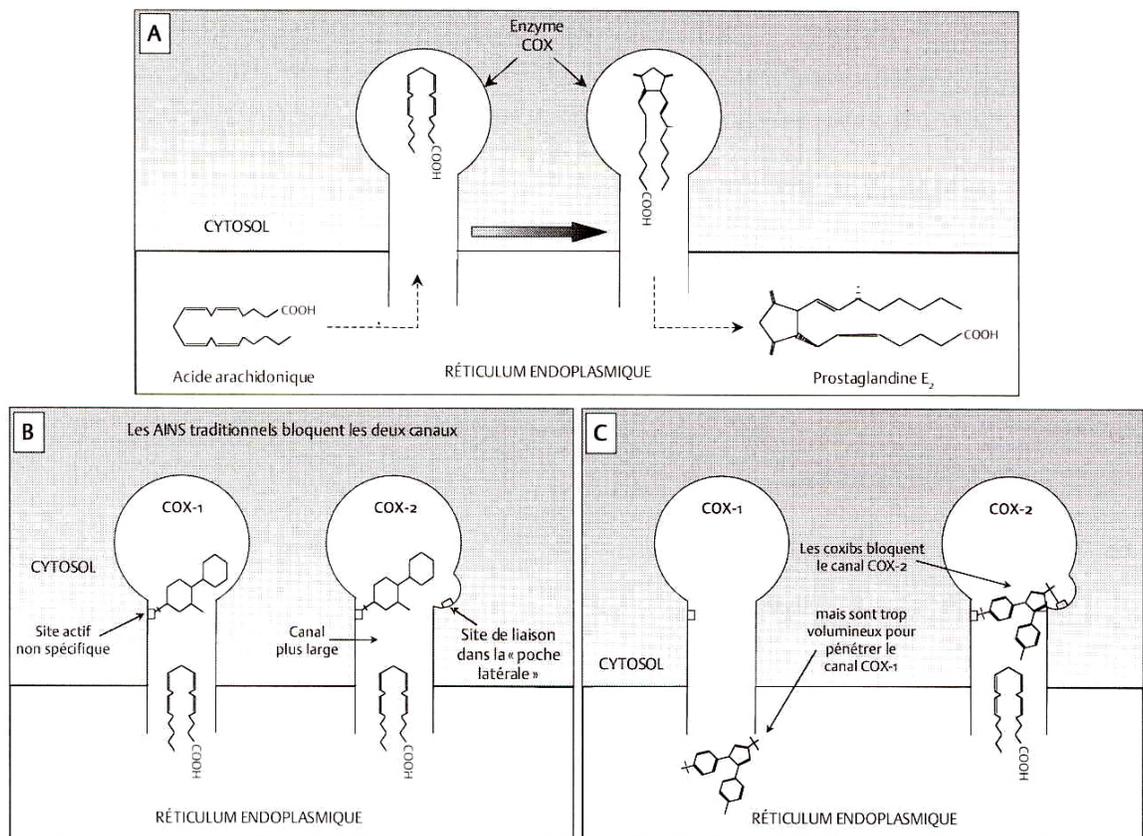


Figure 19. Illustration de la structure des enzymes cyclo-oxygénases 1 et 2 retrouvées au sein de la membrane cellulaire. L'action des COXs produit des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (A). Les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques se lient à un site non sélectif à l'intérieur des enzymes COX-1 et COX-2, ce qui permet de

bloquer l'accès de l'acide arachidonique à l'intérieur du canal des enzymes et d'inhiber leur action (B). La différence structurale (présence d'une poche latérale sur la COX-2) des deux enzymes permet une liaison sélective des coxibs à l'intérieur du canal enzymatique de la COX-2. Les coxibs sont des molécules trop volumineuses pour pénétrer à l'intérieur du canal de la COX-1 et ne peuvent ainsi les bloquer (C). Tirée de Fletcher, 2005.

Les agents inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (les coxibs) avaient à l'origine, les espérances des propriétés anti-inflammatoires des AINS traditionnels, mais sans les désavantages associés aux effets secondaires gastro-intestinaux (Lipsky et al., 2000). Présentement au Canada, seul le célécoxib (Celebrex®) est accessible, sur prescription seulement. En 2004, Santé Canada a retiré du marché le rofécoxib (Vioxx®) et le valdécoxib (Bextra®) pour des raisons de sécurité reliées aux effets secondaires cardiovasculaires (Laupacis et al., 2005). De nouveaux coxibs ont récemment été développés et possèdent une double action inhibitrice, soit par l'inhibition de la lipoxigénase (agents appelés COX-LOX) ou encore des agents couplés des groupements donneurs de NO (Neogi et Scholz, 2009). Ces agents sont principalement des anti-inflammatoires avec une sécurité gastro-intestinale améliorée, mais sont toujours associés à un risque accru d'ischémie du myocarde (Antman et al., 2007; Wieland et al., 2005). La majorité des patients atteints d'arthrose sont âgés et sont souvent plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires. Cela rend le choix des AINS inhibiteurs de la COX-2 peu approprié pour un traitement à long terme chez ce groupe de patients. De façon globale, les AINS sont administrés oralement mais aussi de façon topique, intra-articulaire ou intraveineuse. Les AINS ont de longs délais d'action, quelle que soit la voie d'administration (Fletcher, 2005).

3.6.1.3. Opioides

Un traitement aux opioïdes est indiqué en dernier recours chez les patients ayant de la douleur reliée à l'arthrose sévère et réfractaire (Bradley, 2004). Les opioïdes sont

rapportés comme des agents agissant sur le SNC et le SNP. Une injection intra-articulaire à faible dose de morphine a démontré une efficacité dans la réduction de la douleur (Stein et al., 1991). Les mécanismes centraux prédominent lorsque des opioïdes exogènes sont administrés de façon systémique dus à la grande densité de récepteurs opioïdes dans le SNC et de la perméabilité de celui-ci aux opioïdes exogènes (Bradley, 2004). Contrairement aux AINS, les opioïdes exogènes sont actifs en présence ou non de l'inflammation (Chauvin et Beaulieu, 2005). Les opioïdes les plus prescrits pour la douleur reliée à l'arthrose sont le tramadol, le proxyphène, la codéine et l'oxycodone. Par ailleurs, la grande distribution des récepteurs opioïdes dans l'organisme fait en sorte qu'ils sont associés à divers effets secondaires. Les opioïdes peuvent déprimer le système respiratoire, induire une bronchoconstriction, ralentir la motilité gastro-intestinale, provoquer des nausées et vomissements et avoir des effets indésirables au niveau des systèmes cardiovasculaire, urinaire et oculaire (Chauvin et Beaulieu, 2005). Ils ont également pour effet de déprimer le système locomoteur, ce qui accroît grandement le risque de chute pouvant aggraver les lésions articulaires. De plus, la tolérance au traitement peut survenir et implique une augmentation de la dose dans le temps afin de continuer à produire les effets analgésiques. La prise répétée d'opioïdes peut engendrer une dépendance physiologique et/ou psychologique au médicament.

3.6.1.4. Analgésiques naturels

Plusieurs extraits de dérivés de plantes sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques et offrent une alternative potentiellement plus sécuritaire et moins onéreuse aux traitements pharmacologiques conventionnels. Certains dérivés sont reconnus pour leur efficacité dans le traitement de la douleur reliée à l'arthrose. Parmi ceux-ci, la capsaïcine est la plus rapportée et est administrée par application topique (Towheed et Hochberg, 1997). La capsaïcine est un dérivé alcaloïde de la plante *Capsicum* et est l'ingrédient actif du piment fort. La capsaïcine est utilisée pour le traitement de la douleur neuropathique engendrée par diverses conditions telles que le diabète et les névralgies faciales et post-herpétiques (Bernstein et al., 1989; Rains et Bryson, 1995; Ross et Varipapa, 1989). Une

application locale de crème à base de capsaïcine induit une déplétion du neuropeptide SP à l'intérieur du neurone, tant en périphérie qu'au niveau central. Il a été démontré que la capsaïcine stimule la libération de la SP des fibres C afférentes en périphérie et prévient une accumulation à l'intérieur des corps cellulaires et des terminaisons nerveuses (Brandt et Bradley, 2004). Les axones des terminaisons nerveuses retrouvés dans l'articulation voient leur transport externe de SP bloqué. Avec un traitement continu, il est démontré que la synthèse de SP est diminuée (Fitzgerald, 1983). Plusieurs études ont observé l'effet analgésique de l'application topique de capsaïcine, démontrant une réduction de la perception de la douleur modérée en comparaison à un traitement placebo chez des patients atteints d'arthrose du genou (Deal et al., 1991; Towheed et Hochberg, 1997). La validité des résultats de ces études est mise en doute, car l'application de capsaïcine provoque une sensation de brûlure au site d'application. Il devient donc difficile de confondre le traitement du placebo, réduisant ainsi l'aspect aveugle de l'étude. C'est d'ailleurs l'effet secondaire de sensation de brûlure de la peau, en plus des picotements et des démangeaisons, qui rend le traitement à la capsaïcine impopulaire.

La curcumine, principal constituant de la plante *Curcuma longa*, est couramment utilisée comme épice culinaire (carry indien) et est largement documentée pour ses propriétés médicinales (Singh, 2007). Ses propriétés pharmacologiques sont attribuées à ses effets antioxydants et anti-inflammatoires (Sandur et al., 2007; Srimal et Dhawan, 1973). La curcumine agit en tant qu'antioxydant en inhibant la production de NO induite par les IL-1 β (Sreejayan et Rao, 1996). Son activité anti-inflammatoire est rapportée *in vitro* par sa capacité d'inhibition de la transcription génique dépendante du NF κ B, de l'expression des IL-1 β , IL-6 et IL-8 et des PGE₂ dans les chondrocytes bovins et humains ainsi que dans des explants cartilagineux (Brouet et Ohshima, 1995; Schulze-Tanzil et al., 2004; Shakibaei et al., 2007). Toutes ses actions font du curcuma un agent chondroprotecteur (Henrotin et al., 2010). L'efficacité clinique du Meriva®, un composé pharmacologique à base du complexe phytosomique de curcuma-phosphatidylcholine, a récemment démontré une amélioration de la fonction articulaire et une diminution de douleur articulaire perçue chez des patients

atteints d'arthrose du genou suite à une administration quotidienne pour une durée de trois mois (Belcaro et al., 2010). De plus, l'effet anti-hyperalgésique du curcuma serait attribué à son effet antagoniste sur les récepteurs TRPV1 (Yeon et al., 2010).

Il a été démontré qu'une administration orale de gingembre peut être utilisée à des fins thérapeutiques pour l'arthrose. Des études cliniques randomisées et contrôlées ont démontré une réduction significative des symptômes de la pathologie telle que la douleur au genou (Altman et Marcussen, 2001; Bliddal et al., 2000). Par contre, la forte dose orale de gingembre requise pour atteindre une réponse efficace au traitement a souvent induit des malaises gastro-intestinaux (Marcus et Suarez-Almazor, 2001). Pour leur part, les effets topiques du gingembre par l'application de compresses ont démontré une meilleure mobilité de l'articulation et une diminution de la douleur (Therkleson, 2010). Les propriétés anti-inflammatoires reconnues du gingembre telles que l'inhibition de la COX-1 et COX-2 ainsi que la suppression de la synthèse des leucotriènes peuvent être impliquées (Grzanna et al., 2005).

D'autres études récentes rapportent les effets bénéfiques de divers extraits de plantes. Une diminution de la douleur chez des patients atteints d'arthrose du genou a été rapportée suite à l'administration d'extrait de fruit de la passion (Farid et al., 2010) et de molécules flavonoïdes qui ont démontré une efficacité similaire au naproxène (Levy et al., 2009). L'extrait d'écorce de pin de la plante *Pinus pinaster*, est un composé phénolique qui a démontré son efficacité dans l'inhibition sélective des MMPs (Grimm et al., 2004) et de la COX-1 et COX-2 (Schafer et al., 2006). Une étude clinique démontre la réduction de la douleur chez des patients atteints d'arthrose du genou par un traitement oral de Pycnogenol® pour une période de quatre semaines (Cisar et al., 2008). Cette étude suggère un potentiel thérapeutique des phénols pour le traitement de la douleur reliée à l'arthrose.

4. L'eugénol

4.1. Généralité et propriétés

L'huile de clou de girofle est extraite des boutons floraux de l'arbre de girofler (*Eugenia aromatica*). Cette huile est communément utilisée comme épice alimentaire et comme conservatif d'aliments. Il est démontré que l'huile de clou de girofle possède des propriétés antioxydantes lors d'applications pharmaceutiques (Chaieb et al., 2007). Elle permet l'induction de l'apoptose de certaines cellules cancéreuses chez l'humain et est considérée être un agent efficace contre des infections bactériennes lorsqu'utilisée comme agent antiseptique (Pramod et al., 2010). L'analyse chimique de l'huile de clou de girofle par la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse (*gas chromatography/mass spectrometry*, GC/MS) a permis l'identification de 36 composantes (Chaieb et al., 2007). Le principal élément chimique de l'huile de clou de girofle est l'eugénol (4-allyl-2-methoxyphenol) avec une concentration de 85 % et plus.

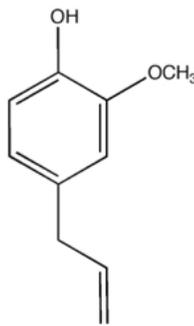


Figure 20. Structure moléculaire de l'eugénol. Source : www.pherobase.com

Cette molécule très lipophile appartient à la famille des phénols, tout comme la capsaïcine. Les phénols sont des composés chimiques aromatiques ayant une fonction hydroxyle (groupement OH). Plusieurs études ont démontré jusqu'à présent que l'eugénol possède des propriétés pharmacologiques variées telles que des effets anesthésiques chez

les amphibiens et les rongeurs (Guenette et al., 2006; Guenette et al., 2007a), antibactériens (Laekeman et al., 1990), antifongiques (Chami et al., 2004; He et al., 2007), anti-anaphylactiques (Jadhav et al., 2004), antihistaminiques (Nishijima et al., 1998), antioxydants (Chen et al., 2009) et anti-inflammatoires par l'inhibition de la synthèse de thromboxanes (Reddy et Lokesh, 1994). L'eugénol est utilisé depuis des décennies en dentisterie à des fins d'analgésie locale (Garibaldi et al., 1995). Lorsqu'il est mélangé avec de l'oxyde de zinc pour créer l'amalgame d'oxyde de zinc et d'eugénol (ZOE), l'eugénol devient un constituant grandement utilisé comme matériel pour le remplissage de prothèses dentaires ainsi que comme scellant lors de traitement de canal (Markowitz et al., 1992). Par contre, l'application directe d'eugénol sur les tissus pulpaire a démontré un effet cytotoxique. Cela s'explique par divers mécanismes biochimiques. L'eugénol peut être oxydé par des enzymes peroxydases, ce qui résulte en un produit toxique pour les hépatocytes murins (Markowitz et al., 1992). L'étude menée par Guenette et al. (2006) a démontré la pharmacocinétique de l'eugénol chez le rat et rapporte que les concentrations plasmatique et sanguine diminuent rapidement suite à une injection intraveineuse avec des temps de demi-vie ($T_{1/2}$) de 7.05 min dans le plasma et de 12.6 min dans le sang, suggérant une distribution rapide de l'eugénol aux tissus périphériques. Cette distribution extravasculaire serait en relation avec les propriétés lipophiliques de l'eugénol. Suite à une administration orale, la concentration d'eugénol dans la moelle épinière était plus grande que la concentration observée dans le plasma et le cerveau des rats. Cela suggère que son action au niveau central peut être plus importante dans la moelle épinière. Par ailleurs, une étude récente rapporte que l'eugénol administré de façon intrathécale pénètre et persiste dans les tissus nerveux (Lionnet et al., 2010).

4.1.1. Mode d'action de l'eugénol

Le mode d'action de l'eugénol n'est pas complètement défini. Plusieurs actions moléculaires ont été rapportées afin d'élucider ses propriétés analgésiques qui déterminent son potentiel inhibiteur de la transmission de l'information nociceptive. L'eugénol qui inhibe les Ca_v , inhiberait aussi les canaux sodiques ($Na_v1.8$ et 1.9) des neurones en

périphérie ainsi que les neurones de la corne dorsale (Park et al., 2006) et retarderait leur activation, diminuant ainsi l'excitabilité neuronale (Cho et al., 2008). L'action moléculaire de l'eugénol sur les récepteurs GABA_A a aussi été rapportée (Aoshima et Hamamoto, 1999). L'eugénol potentialiserait la réponse des récepteurs GABA_A, ce qui induirait un effet sédatif. Cette action moléculaire définit l'effet anesthésique de l'eugénol. De plus, l'eugénol agirait indirectement sur les récepteurs P2X₃ retrouvés sur les nocicepteurs en inhibant les courants d'ATP activateurs de ces récepteurs (Li et al., 2008). Les récepteurs P2X₃ sont co-exprimés avec les récepteurs TRPV1 sur les nocicepteurs. Des études *in vitro* ont démontré l'interaction entre l'eugénol et les récepteurs TRPV1. Les actions pharmacologiques biphasiques (effet piquant initial suivi d'une analgésie retardée) et la structure chimique commune de l'eugénol et de la capsaïcine démontrent que ces deux molécules agissent sur le même récepteur : le TRPV1 (Yang et al., 2003). L'eugénol possède une activité agoniste au récepteur TRPV1 par l'activation de celui-ci via un influx cationique qui engendre une dépolarisation membranaire et induit la transmission de potentiels d'action. Cette activité agoniste est suivie d'une activité antagoniste au récepteur TRPV1, associée à ses propriétés analgésiques (Guenette et al., 2006). Une étude de pharmacodynamie de l'eugénol chez le rat révèle que le $T_{1/2}$ dans le plasma est de 14 heures suivant une administration orale (Guenette et al., 2007b). Ce temps d'élimination relativement lent laisse présager une accumulation d'eugénol suite à une administration orale répétée ainsi qu'un effet de longue durée du blocage des récepteurs TRPV1, résultant en une diminution de la sensibilité à la douleur. Par contre, il est aussi rapporté que l'influx de cations induit par l'activation des récepteurs TRPV1 serait un des mécanismes moléculaires par lequel l'eugénol produirait des effets irritants, tout comme la capsaïcine (Li et al., 2007). L'eugénol modulerait aussi l'action des récepteurs NMDA en bloquant partiellement l'entrée massive d'ions Ca²⁺ à l'intérieur de la terminaison neuronale provoquée par la liaison du glutamate à ces récepteurs (Lee et al., 2005; Wie et al., 1997). De plus, une étude récente a démontré le blocage du courant intracellulaire induit par les canaux cationiques contrôlés à activation par hyperpolarisation (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*, HCNs) par l'eugénol à l'intérieur des fibres A β

des ganglions des neurones trigéminaux de rats neuropathiques (Yeon et al., 2011). Bref, plusieurs mécanismes moléculaires sont responsables des effets analgésiques de l'eugénol.

4.2. Effets de l'eugénol sur la réponse inflammatoire

Par culture cellulaire de ganglions des racines dorsales de moelles épinières de rats, il a été démontré que l'activation des récepteurs NK1 stimule la phosphorylation du TRPV1, ce qui amplifierait la libération de SP (Tang et al., 2008) et initierait la cascade de l'inflammation neurogène. Il peut être suggéré que la modulation des récepteurs TRPV1 par l'eugénol diminuerait la présence de SP dans la moelle épinière car l'activité nerveuse et l'activité vasculaire lors de la réponse inflammatoire sont intimement reliées.

Markowitz (1992) rapporte que l'eugénol à faible concentration est un agent anti-inflammatoire qui protège les tissus en inhibant la fonction chimiotaxique des neutrophiles. Les effets anti-inflammatoires de l'eugénol seraient dus en partie à la suppression des radicaux libres libérés par les leucocytes, action effectuée par le groupement hydroxyle de l'eugénol (Azuma et al., 1986). De plus, l'eugénol a démontré la capacité de supprimer l'expression de cyclooxygénases à l'intérieur de macrophages murins et humains stimulés par des lipopolysaccharides (Kim et al., 2003; Lee et al., 2007). Il agirait comme inhibiteur compétitif à la prostaglandine H synthétase afin de prévenir le couplage de l'enzyme COX et de l'acide arachidonique (Markowitz et al., 1992). L'eugénol inhiberait aussi l'activité enzymatique de la 5-lipoxygénase (5-LOX) à l'intérieur de cellules leucocytaires humaines (Raghavenra et al., 2006). La 5-LOX est l'enzyme clé dans la biosynthèse des leucotriènes produites par la liaison de lipoxygénase et de l'acide arachidonique.

À l'aide d'une analyse de ARNm, il a aussi été démontré que les niveaux protéiques des cytokines IL-1 β et TNF- α sont sous exprimés lors de la réponse inflammatoire dans les tissus pulpairelésés suite à l'administration d'eugénol (Lee et al., 2007). Il a été démontré *ex vivo* qu'un composé similaire à l'eugénol, le resvératrol, inhibe la production d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α (Marier et al., 2005). Une diminution significative de l'œdème

articulaire a été observé chez un modèle rat d'arthrite unilatérale du genou suite à une administration orale de 33 mg/kg d'eugénol durant deux jours consécutifs (Sharma et al., 1994). Toutes ces propriétés pharmacologiques de l'eugénol modifient la réponse inflammatoire suite à une lésion tissulaire, causant ainsi une réponse inflammatoire moins intense en bloquant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires.

5. Évaluation de la douleur chez les modèles animaux d'arthrose

Puisque l'étiologie de la pathologie n'est pas encore complètement comprise et qu'aucun traitement ne soit vraiment efficace, plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'améliorer les connaissances de l'arthrose et son traitement. Les modèles animaux permettent d'étudier la complexité des changements structuraux, leur progression ainsi que l'évolution de la pathologie (Brandt, 2002). Lors de l'étude d'une pathologie humaine, le modèle animal doit représenter certaines ressemblances génétiques naturellement acquises ou expérimentalement induites avec la pathologie retrouvée chez l'humain (Poole et al., 2010). Lorsque le modèle est bien caractérisé, il devient utile pour déterminer des hypothèses reliées à la pathogenèse ou à la thérapie de l'arthrose.

Pour le choix du modèle animal, une attention particulière doit être portée sur les aspects quantitatifs (suffisance de tissus de l'articulation pour l'étude) ou qualitatifs (ressemblance aux tissus humains) (Pritzker, 1994). Plusieurs modèles utilisant de gros animaux ont été établis (chien, chèvre, cheval). Ces modèles demeurent dispendieux et nécessitent une grande période de temps pour le développement de l'arthrose. Ainsi, un petit animal tel que le rat permet de minimiser les coûts alors que les premiers signes de dégénérescence tissulaire peuvent survenir très rapidement. Tout en étant petit, le rat permet des manipulations chirurgicales efficaces. Il est aussi identifié comme un bon modèle animal pour l'étude de l'arthrose grâce à l'identification de son génome (Hedrich, 2000). Par contre, puisque le rat ne développe pas l'arthrose de façon spontanée, à l'instar

d'autres rongeurs comme le cochon d'Indes (Anderson-MacKenzie et al., 2005; Huebner et Kraus, 2006) et la souris (Das-Gupta et al., 1993), certains modèles d'arthrose sont conçus à partir d'une opération chirurgicale alors que d'autres sont induits à l'aide d'injections intra-articulaires d'agents chimiques. Le choix du modèle animal tient à l'objectif de l'étude.

5.1. Modèle chirurgical d'arthrose chez le rat

L'un des modèles animaux le plus utilisé pour l'induction de l'arthrose est celui du sectionnement du ligament croisé antérieur (*anterior cruciate ligament transection, ACLT*). Ce modèle d'arthrose biomécanique se caractérise par l'instabilité de l'articulation, provoquant des changements au niveau du cartilage et de l'os sous-chondral. Il produit une inflammation au niveau du cartilage et de la synovie (Pritzker, 1994). Plusieurs de ces changements surviennent dans les semaines suivant la chirurgie et sont utilisés pour l'observation des changements dans la fonction mécanique du cartilage (Setton et al., 1999). Les grassets des rats ayant eu un sectionnement du ligament croisé antérieur développent une dégénérescence du cartilage articulaire similaire à celle retrouvée dans la pathologie apparaissant de façon naturelle (Karahhan et al., 2001). Suite à l'induction du modèle, Jean et al. (2007) ont observé une inflammation sévère au niveau de l'articulation du grasset 20 semaines après l'opération. L'évaluation macroscopique du cartilage des condyles fémoraux médiaux a démontré une dégénérescence avec formation de fibrillation, d'érosion et d'ulcération. Suite à l'évaluation microscopique, une hyperplasie et une réduction du nombre de chondrocytes dans le cartilage (Jean et al., 2007) ainsi qu'une augmentation précoce de la résorption de l'os suivie d'une importante formation osseuse et d'ostéophytes sont observées (Hayami et al., 2004). Le ACLT sur un modèle murin a permis de déterminer les concentrations de dégradation du collagène de type I et de type II dans l'articulation. L'augmentation de la dégradation du collagène de type II est présente lors de l'évolution de l'arthrose déterminée par l'extraction de protéines dans l'articulation

blessée (Nielsen et al., 2008). De plus, l'étude de Castro et al. (2007) démontre que les rats ayant eu l'ACLT ont un niveau de douleur articulaire significativement plus élevé que les rats contrôles lorsqu'ils doivent supporter leur poids corporel à l'aide de la patte lésée. Les effets du ACLT peuvent être amplifiés par l'addition d'une ménissectomie partielle afin d'accentuer temporellement les dommages tissulaires (Hayami et al., 2006).

5.2. Modèle induit par l'agent chimique mono-iodoacétate

Le modèle le plus couramment utilisé en recherche préclinique sur la douleur articulaire chez les rongeurs est le modèle induit par une injection intra-articulaire de mono-iodoacétate (MIA) (Bove et al., 2009). Sous anesthésie de l'animal, l'articulation fémorotibiale est immobilisée dans un angle de 120° et une aiguille est insérée à l'intérieur de la capsule articulaire au travers du ligament patellaire. Le MIA agit directement sur l'équilibre de l'activité métabolique des chondrocytes et induit une perte des propriétés fonctionnelles du cartilage. L'apport énergétique des chondrocytes provient du phénomène physiologique de la glycolyse. Le MIA perturbe la glycolyse en inhibant l'activité de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, ce qui résulte en une diminution de la synthèse métabolique des cellules et éventuellement à la nécrose (Kalbhen, 1987).

5.2.1. Caractérisation histologique

Le modèle démontre des lésions similaires à la pathologie humaine telles que la perte de chondrocytes et de protéoglycanes ainsi qu'une fibrillation du cartilage (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997). En termes de progressions pathologiques, deux phases distinctes sont rapportées pour ce modèle. La première phase consiste en une réponse inflammatoire maximale 24 heures suivant l'injection et qui diminue au 3^{ième} jour (Bove et al., 2003). Une distension de la membrane synoviale accompagnée d'une infiltration cellulaire est observée. La deuxième phase débute vers le 7^{ième} jour post-injection et provient de la conséquence des changements structuraux (Bove et al., 2003; Ivanavicius et

al., 2007). La réponse inflammatoire est résorbée, mais par contre les lésions articulaires sont permanentes. L'évaluation histologique démontre des dommages au niveau de la région profonde du cartilage et du changement de la configuration de l'os sous-chondral. Une perte du cartilage qui engendre l'exposition de l'os sous-chondral est observés 28 jours post-injection (Guzman et al., 2003; Ivanavicius et al., 2007). La dégénérescence et la nécrose du cartilage articulaire sont accompagnées d'une diminution de la densité minérale osseuse et d'une augmentation de l'activité ostéoclastique conduisant à la formation d'ostéophytes (Pomonis et al., 2005). Les lésions sont diffuses dans l'articulation (compartiments médiaux et latéraux principalement) (Guingamp et al., 1997; Ivanavicius et al., 2007; Janusz et al., 2001). Le modèle MIA est rapide et efficace en terme de progression histopathologique. Les doses de MIA injectées varient entre 0.1 et 3 mg/mL. Étant un agent alkylant non spécifique (Bove et al., 2009), le MIA est capable d'induire à faible concentration des dommages sélectifs aux cellules articulaires. À de fortes concentrations, une destruction massive des cellules se produit. La sévérité des lésions articulaires est donc dépendante de la dose administrée, tout comme la réponse douloureuse associée (Schuelert et McDougall, 2009). Ce modèle est davantage approprié pour l'évaluation de voies thérapeutiques visant à diminuer la douleur plutôt que pour l'évaluation des traitements qui permettent une modification de la pathologie puisqu'une étude a récemment rapporté qu'il n'existe pas de similitude entre l'expression génétique du modèle MIA et celui de l'humain lors de la progression de l'arthrose (Barve et al., 2007).

5.3. Outils d'évaluation préclinique de douleur

L'évaluation comportementale est l'outil primordial pour quantifier le niveau de douleur perçue chez l'animal. Neugebauer (2007) identifie clairement les différentes méthodes utilisées afin de quantifier la douleur chez des modèles animaux murins d'arthrose induite dans l'articulation du genou. Des tests pour déterminer une différence quantifiable de la distribution de la masse corporelle entre les membres de l'animal (test

d'incapacité), pour analyser la posture et la démarche de l'animal, pour évaluer le niveau d'activité locomotrice (biotéléométrie), pour noter la sensibilité mécanique ou thermique (filaments de nylon calibrés, analgésiomètre), pour mesurer le seuil douloureux de l'angle articulaire (trigonométrie) ou encore pour déterminer le degré de douleur perçue par l'animal par la vocalisation (ultrasons) sont utilisés (Neugebauer et al., 2007).

5.3.1. Mesure de l'allodynie et de l'hyperalgésie

Afin d'évaluer les phénomènes physiologiques de douleur chez les rats arthrosiques, diverses techniques sont couramment utilisées en laboratoire de recherche. Pour l'évaluation de l'allodynie mécanique, le test d'application de filaments de nylon calibrés, ou fils de von Frey, est le plus souvent utilisé. Une pression exercée par le filament est appliquée et maintenue pendant quelques secondes sous la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal (Figure 21). Si l'animal ne réagit pas, un fil de plus gros calibre exerçant une plus grande pression est utilisé. Lorsque l'animal réagit par une élévation de la patte, le calibre du filament est noté. Le test de von Frey mesure le seuil de retrait de la patte, c'est-à-dire la stimulation mécanique nociceptive qui engendre le réflexe de retrait (Schmelz et al., 2010). Le réflexe de retrait est l'action que l'animal produit afin d'éviter la source produisant l'inconfort nociceptif. Puisque l'arthrose est présente dans l'articulation du genou (site primaire), l'allodynie mécanique secondaire (site éloigné de la lésion) est évaluée. Certains groupes de chercheurs essaient de mettre au point une technique qui permettrait d'évaluer l'allodynie mécanique primaire, or la seule technique rapportée jusqu'à présent est celle de la vocalisation suite à la flexion de l'articulation du genou (*knee bend test*) (Ferreira-Gomes et al., 2010). Cette technique ne fait pas l'unanimité par son aspect subjectif lors de la collecte de données.

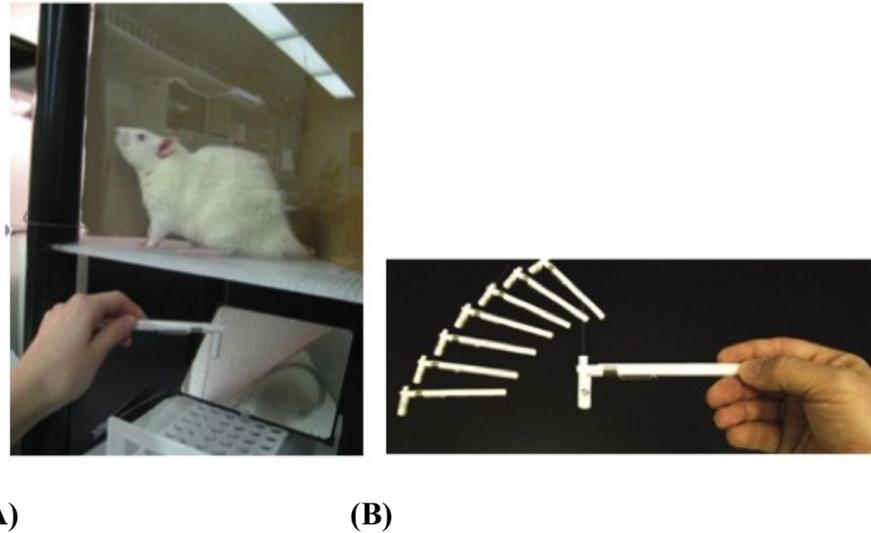


Figure 21. *Appareillage pour le test de von Frey utilisant des filaments de nylon calibrés. Les filaments sont appliqués sous la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal afin d'évaluer la sensibilité mécanique. Sources : (A) Laboratoire du Dr Vachon, Université de Montréal. (B) Laboratoire du Dr Bartnik, Sanofi-Aventis.*

Afin d'évaluer l'hyperalgésie liée à une douleur neuropathique, le test de retrait de la patte suite à une stimulation thermique (test de Hargreaves) est couramment employé en laboratoire (Figure 22). Ce test mesure aussi le seuil de retrait de la patte. L'application d'une source lumineuse sous la surface plantaire de la patte de l'animal produit une chaleur. Cette application thermique est maintenue jusqu'à ce qu'une réaction de l'animal soit observée. Un temps limite de 20 s est respecté afin de préserver l'intégrité tissulaire de la surface plantaire. Lorsque l'animal effectue un réflexe de retrait de la patte suite à la stimulation thermique, le temps de réaction est noté et devient la donnée du seuil de retrait de la patte.



Figure 22. *Appareillage pour l'évaluation de l'hyperalgésie thermique par le test de Hargreaves. Une stimulation thermique est appliquée sous la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal. Source : Photographie du laboratoire du Dr Vachon, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.*

5.3.2. Analyse de la démarche

L'analyse de la démarche est une méthode quantitative pour identifier des facteurs mécaniques qui peuvent être importants à divers niveaux de l'avancement de la progression de la pathologie (Asthen et al., 2008). Elle peut comprendre l'évaluation des paramètres cinétiques tel que le support de la charge analysé à l'aide de plateformes de force. Des paramètres cinématiques incluant l'amplitude de mouvement de l'articulation ainsi que les diverses phases du cycle de marche sont aussi analysés et procurent des informations sur l'aspect dynamique du patron de marche.

5.3.2.1. *CatWalk*TM

De récentes études démontrent l'efficacité d'un nouvel appareil, le *CatWalk*TM, qui permet de quantifier de façon objective la perception de douleur des animaux en évaluant plusieurs paramètres de la démarche. Le *CatWalk*TM a été développé par Frank Hamers à l'*Institute Rudolph Magnus* aux Pays-Bas. Il s'agit d'un système qui mesure de façon dynamique le patron de marche de chacune des pattes du rongeur de manière isolée. Le *CatWalk*TM est constitué d'une surface de contact de verre entourée de murs opaques qui délimitent un corridor dans lequel l'animal déambule. Un bulbe de lumière est situé tout le long du corridor. Lorsque la lumière ambiante de la pièce est éteinte, la lumière émise par le bulbe traverse la surface de verre et est complètement réfléchiée vers l'intérieur. De cette façon, la lumière qui s'échappe provient seulement des régions où l'animal fait contact avec la surface de verre. Avec précision, cette méthode détecte le contact du dessous de la patte avec la surface de verre. Sous la surface de verre, une caméra vidéo capte les régions illuminées et envoie l'image vidéo à un ordinateur relié qui enregistre l'information par l'entremise du logiciel spécifique du *CatWalk*TM. Cet appareillage est produit et distribué par la compagnie Noldus. Plusieurs études l'ont utilisé pour diverses pathologies telles que des lésions de la moelle épinière (Couto et al., 2008; Hamers et al., 2006), des lésions des nerfs périphériques des membres postérieurs (Bozkurt et al., 2008; Deumens et al., 2007) et chez des animaux ayant de la douleur inflammatoire unilatérale postérieure de la patte (Angeby-Moller et al., 2008; Gabriel et al., 2007) (Figure 23).



Figure 23. Illustration représentant l'appareil CatWalk™. L'animal déambule à sa propre vitesse dans un corridor opaque avec une surface de verre comme plancher. Lors de la pose des pattes du rongeur sur la surface de verre, la lumière est réfléchiée vers l'intérieur sous les pattes de l'animal. Sous le corridor, une caméra vidéo capte le patron de marche de l'animal. Cette caméra vidéo est reliée à un ordinateur qui analyse les images à l'aide du logiciel CatWalk™. Tirée du site internet de la compagnie Noldus (www.noldus.com).

Le CatWalk™ permet l'analyse d'une variété de paramètres. Certains tiennent compte d'une seule patte (phase d'appui, phase d'oscillation, période de propulsion, période d'absorption, longueur et largeur de l'empreinte de la patte, intensité de la pose de la patte) alors que d'autres sont reliés à la position des empreintes (longueur de la foulée, largeur de la base de support, positions relatives des pattes). De plus, certains paramètres permettent d'évaluer la coordination de l'animal (patron des poses alternées des pattes, index de régularité, période entre la pose des pattes). Il est donc possible d'identifier et d'observer plusieurs aspects fonctionnels du patron de marche des animaux. Un des avantages du CatWalk™, à l'opposition à d'autres méthodes d'analyse de la démarche chez les rongeurs, est l'absence d'une vitesse de déplacement imposée. L'animal peut donc traverser le corridor à sa vitesse normale, selon sa condition. Chez un modèle rat de douleur neuropathique (lésion chronique par une constriction du nerf sciatique (CCI)), une forte corrélation au niveau de la perception de la douleur a été établie entre les résultats obtenus de l'analyse des phases d'appui et d'oscillation évaluées à l'aide du CatWalk™ et les résultats du seuil de retrait de la patte évalué avec le test de von Frey (Vrinten et Hamers, 2003). Plus récemment, il a été démontré qu'il n'y avait pas de corrélation entre le

développement de l'allodynie mécanique secondaire et les changements dans les paramètres de la démarche évalués à l'aide du CatWalk™ chez un modèle rat de douleur inflammatoire chronique au niveau du grasset (Gabriel et al., 2009).

5.4. Analyse de marqueurs biologiques lors de la pathologie

L'étude de marqueurs biologiques, ou biomarqueurs, a connu un progrès énorme lors des dernières années. Un biomarqueur est défini comme un indicateur d'un état physiopathologique et peut être mesuré et évalué de façon objective (Poole et al., 2010). Ces biomarqueurs peuvent être une réponse physiologique telle qu'une accentuation de la fréquence cardiaque ou une diminution de la consommation d'oxygène, mais ils peuvent aussi être moléculaires (enzymes, macromolécules, protéines, neuropeptides) (Ritsner et Gottesman, 2009). Ces molécules peuvent se retrouver à l'intérieur des tissus ou des fluides biologiques (liquide synovial, sérum, sang, urine, liquide céphalorachidien) et sont utilisées dans divers champs d'études scientifiques. Dépendamment de l'application, ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour l'évaluation des risques de développer un état pathologique, pour l'identification d'une pathologie ou de son stade de progression, ou encore pour prédire une réponse à un traitement. Un biomarqueur doit donc refléter le processus pathophysiologique, être spécifique, doit se mesurer de façon répétée et doit être reproductible (Ritsner et Gottesman, 2009).

Il est alors possible de caractériser les événements neurophysiologiques impliqués dans la douleur associée au processus dégénératif de l'arthrose en analysant les variations de concentrations des biomarqueurs de douleur. Le système nerveux possède un remaniement protéinique assez rapide, donc la quantification de biomarqueurs neurogènes tels que les neuropeptides devient une indication informative importante de l'activité neuronale qui survient lors de la progression temporelle de la douleur (Poole et al., 2010).

5.4.1. Bioanalyse - Les principes de base de la méthode LC-ESI/MS/MS et autres techniques utilisant la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS) est l'une des techniques analytiques les plus sensibles et spécifiques pour l'analyse de peptides. Elle peut déterminer de façon très précise le poids moléculaire de biomolécules allant de 10^{-15} femtomole (fmol) jusqu'à 10^{-18} attomole (amol) (Moyer et al., 2003). La spectrométrie mesure le rapport entre la masse et le nombre de charge (m/z) des ions de protéines ou de peptides en phase gazeuse. Le spectromètre est divisé en trois éléments distincts selon leur fonction : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur (Figure 24).

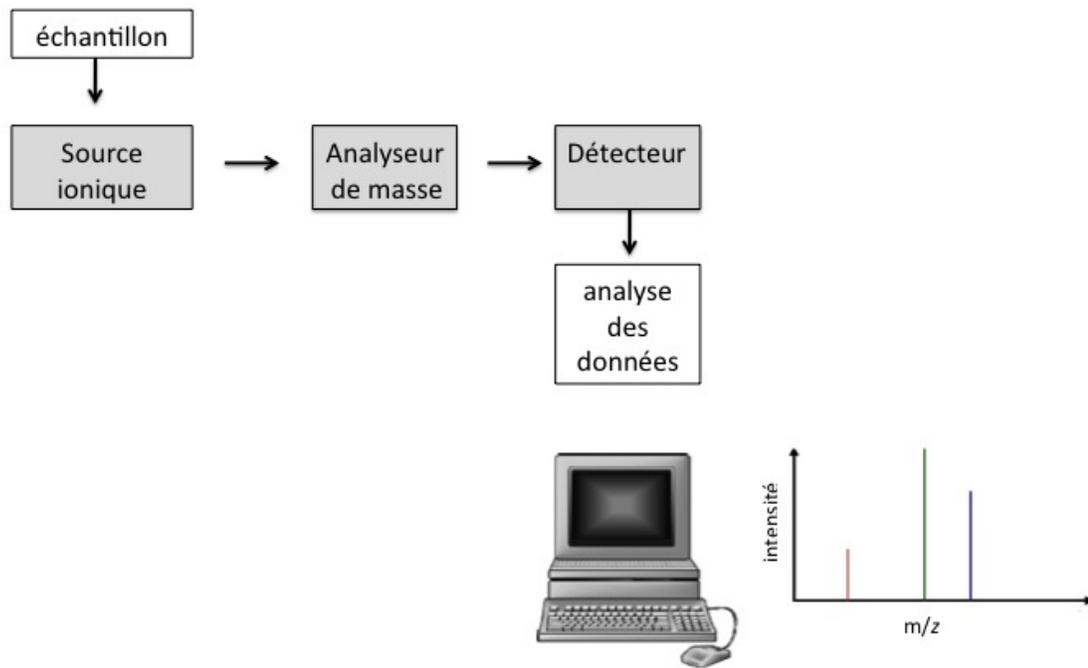


Figure 24. Schéma d'un spectromètre de masse. L'appareillage comprend l'assemblage de trois outils distincts et successifs : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur.

Afin de permettre l'analyse des molécules en phase gazeuse, la première étape est leur ionisation. Une source d'ionisation permet la séparation des molécules induite par la différence de potentiel de la source à l'aide d'un champ électrique. Plusieurs méthodes d'ionisation sont utilisées telles que l'ionisation chimique par pression atmosphérique, l'ionisation par co-cristallisation matricielle d'où les ions sont générés par une exposition aux protons et l'ionisation par électrons. La plus courante est l'ionisation par jet dans un champ électrique (*electrospray ionisation*, ESI) qui est générée par la dispersion de la molécule en phase liquide en de petites gouttelettes à l'intérieur d'un champ électrique (électronébulation). Toutes ces techniques résultent en une libération d'ions à chargement soit positif ou négatif en phase gazeuse (Manz et al., 2004).

Par la suite, un analyseur effectue le triage des ions en fonction de leur rapport m/z . C'est à l'intérieur de l'analyseur que les ions sont analysés par sélection, activation et dissociation séquentiellement dans le temps (Griffiths et Wang, 2009). Ce procédé se fait de différentes façons selon l'analyseur utilisé. Les ions peuvent être isolés de façon sélective par un champ électrique à l'intérieur de trappes ioniques (cylindrique, linéaire, quadripolaire), par temps de vol (*time of flight*, TOF) ou par un champ magnétique (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, FT-ICR MS).

De plus, la méthode de spectrométrie permet d'identifier l'abondance ionique par l'intensité d'un signal obtenu. Les ions sont détectés et groupés selon leur abondance en fonction de leur m/z par un système informatique qui traite les données acquises (le détecteur), ce qui permet de déduire leur poids moléculaire. Un groupement représente ce que l'on appelle un spectre de masse, c'est-à-dire une représentation graphique où l'abscisse représente le rapport m/z et l'ordonnée représente l'abondance des ions. La masse est observée par déconvolution d'un ion moléculaire, c'est-à-dire par l'ajout d'un électron à la molécule neutre (masse M , charge $+1 = M^+$) ou d'un ion par l'ajout d'un proton sur la masse moléculaire en mode positif (masse $+1$, charge $+1 = (M+H)^+$). Selon la méthode d'analyse utilisée, parfois la masse est observée à l'aide d'ions multichargés par l'ajout d'un nombre z de protons (en mode positif) (masse $M + z$, charge $+z = (M+zH)^{z+}$).

Les pics qui apparaissent sur le spectre de masse représentent les valeurs de m/z des différents pics isotopiques du peptide (Canas et al., 2006). Le pic le plus abondant possède une masse qui se rapproche de la masse moyenne. Le spectre de masse du peptide isolé est ensuite comparé à un spectre théorique retrouvé dans une base de données de protéines comme celle de Swiss-Prot, SEQUEST et PeptideSearch (Cravatt et al., 2007; Griffiths et Wang, 2009) ou à l'intérieur d'outils bio-informatiques tels que mMASS (Strohalm, 2011). La concordance du spectre obtenu et du spectre théorique identifie la protéine ou le fragment protéolytique. Des algorithmes de déconvolution sont disponibles afin de transférer l'échelle obtenue par les spectres de masse en masses réelles.

Les avancées récentes dans le domaine de la spectrométrie de masse ont permis l'analyse de l'expression différentielle protéomique de grande envergure en offrant l'identification simultanée de plusieurs molécules à la fois sans l'utilisation d'électrophorèse par gels, technique qui démontrait plusieurs limitations fonctionnelles telles que le temps requis pour la préparation des échantillons et la reproductibilité. Une mauvaise adhérence de la protéine sur le gel diminue aussi sa capacité de détection de protéines en faible abondance (Arora et al., 2005). L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est devenue la technique de choix la plus employée pour l'identification et la quantification de molécules (Halquist et Thomas Karnes, 2011).

5.4.1.1. Chromatographie liquide par phase renversée à haute performance

C'est dans l'appareil de chromatographie liquide par phase renversée à haute performance (*High performance liquid chromatography*, HPLC) que les constituants du mélange tissulaire sont séparés. La chromatographie des molécules est effectuée en fonction de leur affinité spécifique pour les phases mobile et stationnaire selon les coefficients de partage du soluté dans les différentes phases (Figure 25). Suite à l'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique, les molécules sont entraînées par un

liquide (phase mobile) et déplacées à travers un solide (phase stationnaire) et séparées selon leur degré d'affinité pour les phases stationnaire et mobile. Les forces d'interaction entre les molécules et la colonne définissent le temps de rétention ainsi que leur solubilité dans la phase mobile.

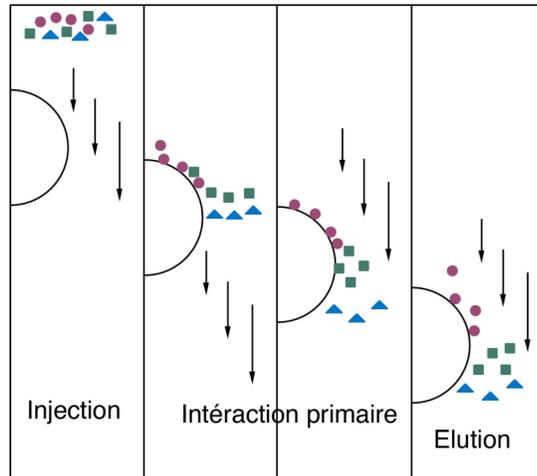


Figure 25. Les étapes d'une séparation d'un échantillon liquide dans une colonne chromatographique liquide à haute performance (HPLC). Les formes géométriques représentent les différents composés retrouvés dans l'échantillon lors de l'injection dans la colonne chromatographique. Suite à l'injection de l'échantillon, les molécules interagissent avec la phase solide (interaction primaire). Les interactions sont variables d'une molécule à l'autre selon leurs propriétés physico-chimiques, ce qui occasionne des temps de rétention variés (élution). La séparation des molécules s'effectue selon les différentes interactions avec la phase solide et la phase liquide présentes dans la colonne. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

5.4.1.2. Source d'ionisation par jet dans un champ électrique

L'ionisation par jet dans un champ électrique (*electrospray ionisation*, ESI) est une méthode d'ionisation à pression atmosphérique qui produit des ions monochargés et multichargés. Cette interface permet un bon couplage entre la chromatographie liquide et l'analyseur. L'arrivée de cette méthode en spectrométrie de masse a permis une avancée considérable dans ce domaine et a valu au Professeur John B. Fenn le prix Nobel de chimie en 2002 (Fenn et al., 1989).

L'éluât qui résulte de la séparation obtenue par HPLC est introduit dans la source d'ionisation au travers d'un capillaire maintenu à haut voltage, typiquement de 3 à 5 000 V. C'est à l'intérieur de cette source que se produit la formation d'ions en phase gazeuse par l'application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique. Un haut débit d'azote favorise la formation de fines gouttelettes hautement chargées. Les gouttelettes sont vaporisées et déplacées vers la trappe ionique sous l'influence du champ électrique induit par la différence de potentiel de la source et de l'interface (Figure 26). Les gouttelettes s'évaporent rapidement, ce qui provoque une concentration des charges (limite de Rayleigh) provoquant ainsi plusieurs fissions (explosions coulombiennes) (Figure 27). Le champ électrostatique qui les entoure est suffisamment intense pour expulser les ions en phase gazeuse. La molécule maintenant sous forme ionique protonisée ($[M+nH]^{z+}$) et en phase gazeuse est transportée vers l'orifice du spectromètre de masse. Une ségrégation moléculaire se produit en fonction de la charge ionique. Les molécules chargées se déplacent rapidement vers l'analyseur alors que les molécules non chargées ne sont pas attirées par le champ électrique.

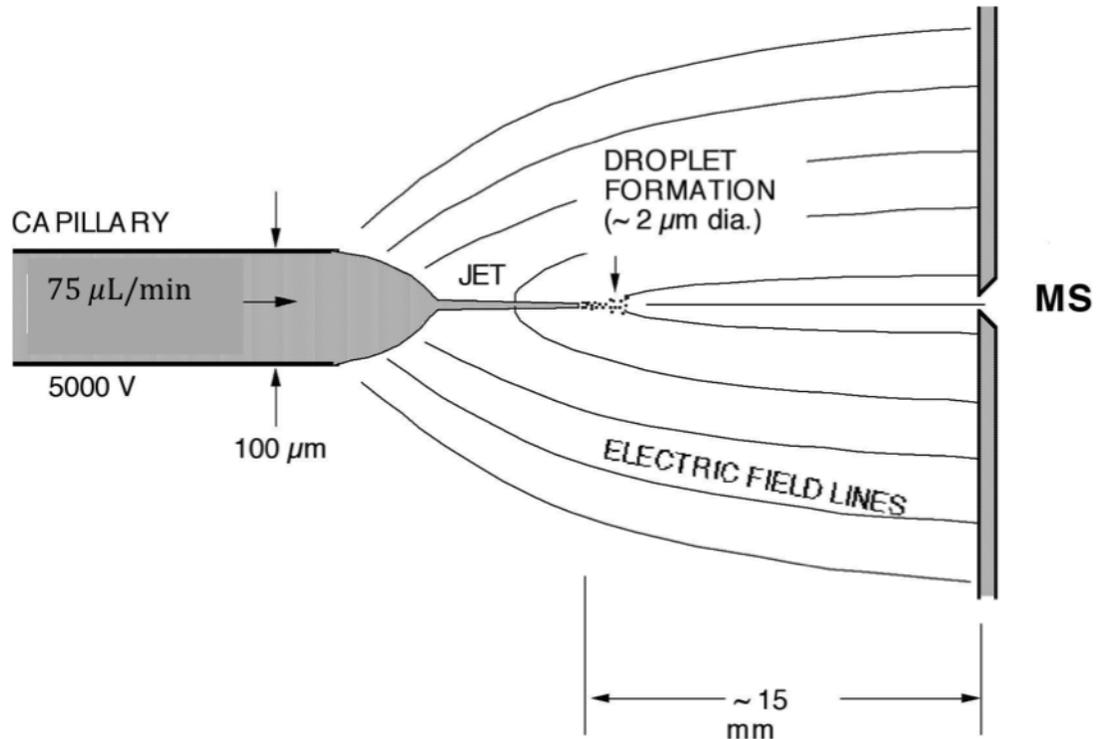


Figure 26. Illustration d'une source d'ionisation ESI typique. Le liquide contenant les peptides traverse avec un faible débit (dans ce cas-ci $75\ \mu\text{L}/\text{min}$) le capillaire pour former des ions en phase gazeuse par l'application à pression atmosphérique d'un champ électrique. Les ions sont ensuite vaporisés par jet dans un champ électrique à haut voltage. Il en résulte de petites gouttelettes chargées qui sont transportées par le champ électrique vers l'orifice du spectromètre de masse afin d'être analysées. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

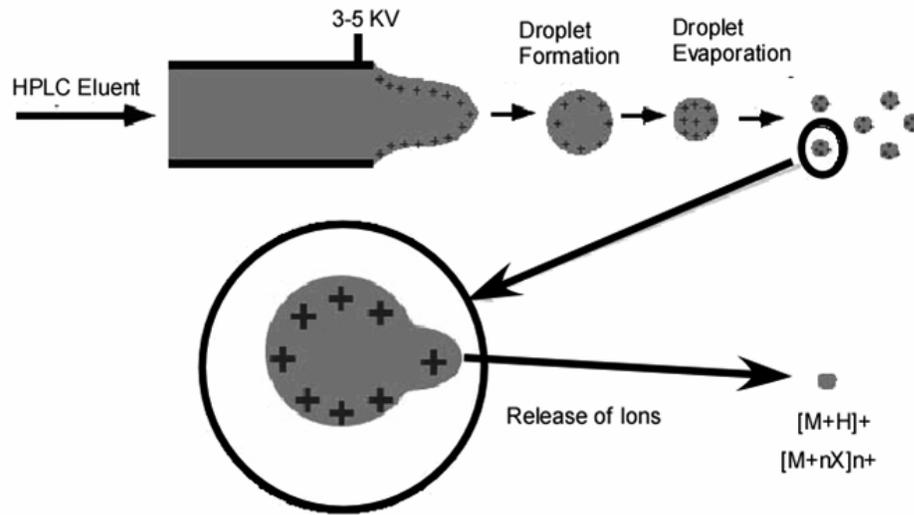


Figure 27. Schéma simplifié du processus d'évaporation des ions à l'intérieur de la source d'ionisation. Les gouttelettes formées subissent plusieurs fissions (explosions coulombiennes). Ces fissions réduisent leur taille et augmentent leur densité de charge. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

5.4.1.3. Spectrométrie de masse en tandem

La plupart des études analysant les peptides utilisent l'instrumentation de spectrométrie de masse en tandem (*tandem mass spectrometry*, MS/MS) qui permet l'identification de peptides cibles venant d'un mélange protéinique complexe. Cette méthode consiste en l'isolation des ions d'un même rapport m/z et à leur fragmentation successive qui permet de caractériser la structure moléculaire du peptide (Figure 28). Par la suite, les ions obtenus par fragmentation sont analysés. Le MS/MS inclut deux analyseurs de masse qui sont séparés par une cellule de collision qui contient un gaz de collision tel que l'argon, l'azote, le xénon ou l'hélium. Le balayage ionique effectué par MS/MS consiste en un ion précurseur (ion parent) qui est sélectionné par le premier MS et

fragmenté dans la cellule de collision par dissociation induite par collision (*collision-induced dissociation*, CID) avec des molécules gazeuses neutres.

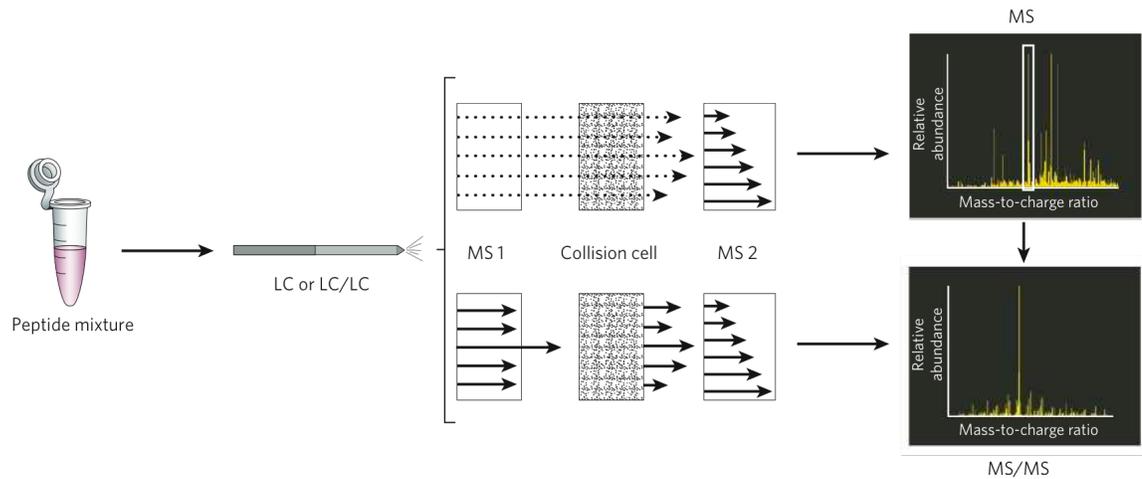


Figure 28. Principes de bases de la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide et ionisation par jet dans un champ électrique (LC-ESI/MS/MS). Suite à la fragmentation des peptides retrouvés dans la solution, une analyse des ions produits est effectuée par un premier spectromètre de masse. Les ions subissent une dissociation par collision avec des molécules gazeuses à l'intérieur de la cellule de collision (*collision cell*). Ensuite, les ions fragmentés à nouveau sont mesurés par leur abondance en fonction de leur ratio m/z à l'intérieur du second spectromètre de masse, ce qui produit un spectre de masse en tandem pour les ions d'un peptide (MS sur la figure). Suite à l'analyse par un logiciel, une séquence d'acides aminés est produite pour chacun des peptides étudiés. Tirée de Cravatt et al., 2007.

L'ion fragment résultant est alors analysé soit par mode en balayage ou par sélection d'un seul ion fragment à la fois. Une nomenclature a été établie pour la fragmentation des peptides (Roepstorff et Fohlman, 1984). Les ions qui portent l'extrémité N-terminale sont indiqués par a, b et c, alors que s'ils portent l'extrémité C-terminale, ils sont notés par x, y

et z. Le nombre d'acides aminés que contient l'ion est indiqué par le nombre accompagnant l'indication ionique. Les ruptures des liaisons peptidiques se font aux ions b et y (Figure 29).

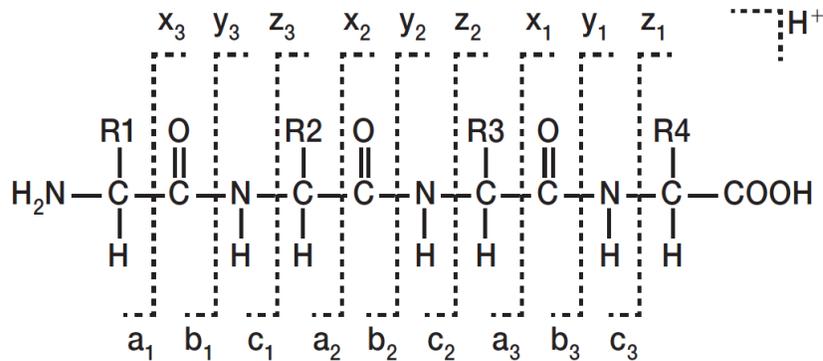


Figure 29. Représentation du patron de fragmentation typique d'un peptide observé par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La nomenclature acceptée des ions fragments des peptides y est représentée. Les ions fragments qui portent l'extrémité N-terminale sont nommés a, b et c alors que les ions qui portent l'extrémité C-terminale sont nommés x, y et z. Le numéro placé en indice indique son contenu en acide aminé. Source : Laboratoire du Dr Francis Beaudry, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

La masse ionique produite (m/z) de l'ion fils est ensuite mesurée par le second MS. Un spectre de masse est généré pour la séquence d'acides aminés de chacun des peptides analysés (Figure 30). L'état de charge est déterminé par l'écart entre les pics des amas isotopiques observés sur le spectre de masse. La charge ionique est déterminée par la distance entre deux pics consécutifs qui correspond à $1/z$.

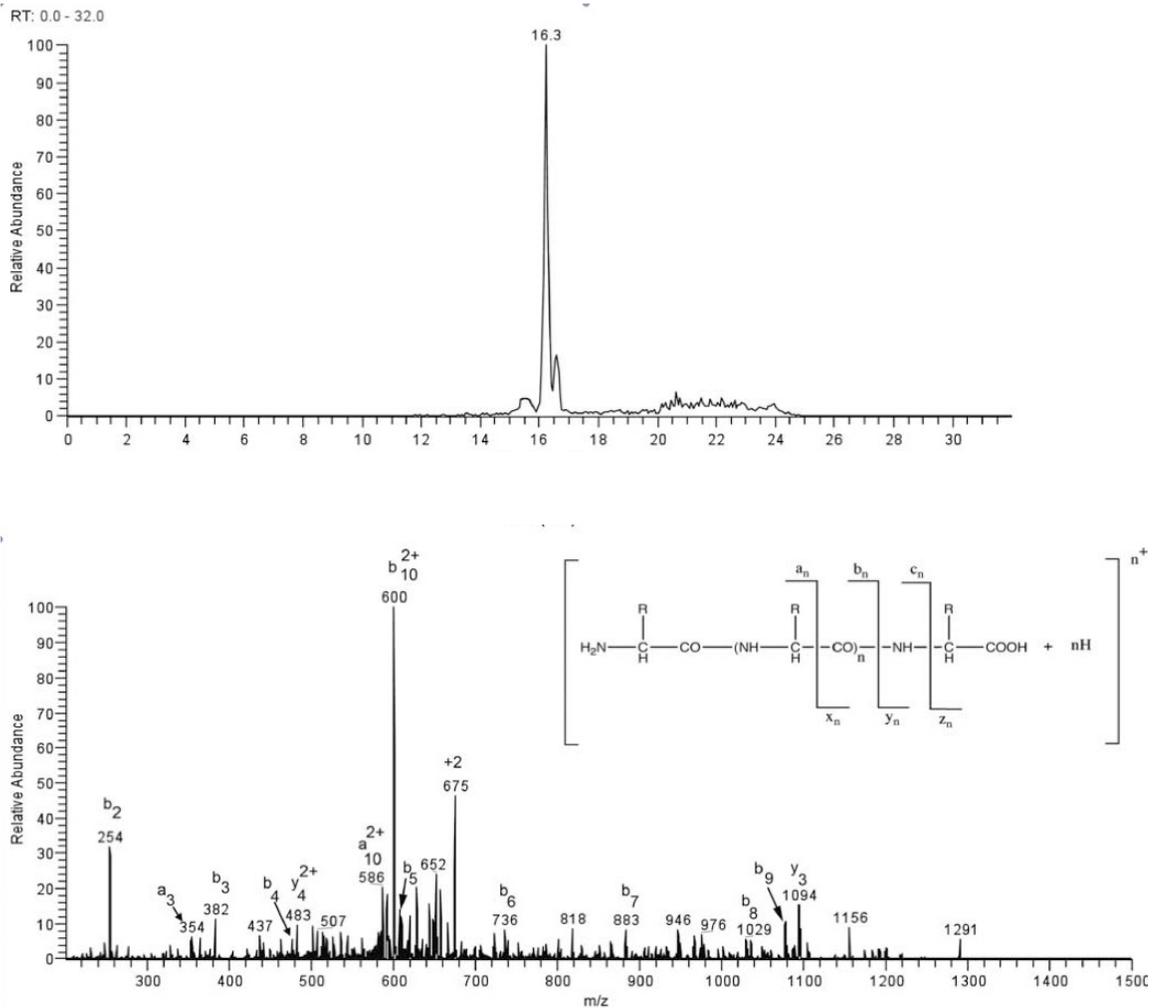


Figure 30. Exemple d'un spectre de masse, dans ce cas-ci de la substance P. La dissociation induite par la collision dans le spectromètre de masse produit une masse ionique (m/z) du fragment protéolytique. Les fragments de séquences d'acides aminés de la substance P sont détectés et groupés selon leur abondance en fonction de leur m/z . L'analyse des données obtenues se fait par la comparaison entre le spectre de masse obtenu et le spectre théorique retrouvés dans une base de données. Tirée de Beaudry et al., 2009.

L'utilisation de la méthode HPLC-ESI/MS/MS pour l'analyse des neuropeptides offre l'opportunité d'étudier des mécanismes spécifiques de la neurotransmission associés à un état pathologique. Cette méthode procure de l'information sur la structure des neuropeptides permettant ainsi leur identification par leurs patrons de fragmentation des séquences d'acides aminés obtenues qui sont comparés à des spectres de référence. De plus, la méthode HPLC-ESI/MS/MS procure une alternative de quantification précise du contenu du neuropeptide dans l'échantillon analysé. En plus d'élucider les mécanismes centraux de douleur par l'identification et la quantification de neuropeptides, il est possible d'évaluer par cette méthode le potentiel thérapeutique d'une molécule aux propriétés analgésiques en observant la modulation de ces neuropeptides suite au traitement.

6. Objectifs de l'étude

Les traitements pharmacologiques analgésiants actuels à base de molécules synthétiques sont trop souvent associés à de multiples effets secondaires. C'est pourquoi il y a un intérêt grandissant pour les molécules naturelles dans la société occidentale. Les extraits de dérivés de plantes ont démontré leurs vertus depuis des siècles dans certaines cultures. Présentement, certaines molécules naturelles sont identifiées comme traitement complémentaire bénéfique aux traitements conventionnels. Considérant que des études précédentes ont démontré le potentiel analgésique de l'eugénol lors de conditions neuropathiques, une hypothèse a été émise indiquant que l'eugénol pourrait avoir des effets bénéfiques sur la douleur chez un modèle animal d'arthrose. Dans un premier temps, le choix approprié du modèle murin d'arthrose s'est imposé. Il était important d'employer un modèle qui générerait non seulement des lésions tissulaires au niveau de l'articulation, mais aussi un comportement démontrant clairement une réponse douloureuse. Suite au choix du modèle murin d'arthrose le plus approprié pour la continuité du projet, l'étude du potentiel analgésique de l'eugénol a débuté par l'évaluation comportementale de rats mâles de type

Sprague-Dawley suivant une injection intra-articulaire de l'agent chimique induisant des lésions tissulaires. Par la suite, des composantes objectives des mécanismes moléculaires de la douleur ont été approfondies davantage. Une meilleure caractérisation des mécanismes neuronaux permettra d'éventuelles études évaluant des traitements pharmacologiques à divers stades de la pathologie représentés dans le modèle animal évalué. L'étude s'est donc divisée en trois volets distincts :

- Déterminer un modèle murin approprié d'arthrose unilatérale au niveau du grasset pour l'objectif principal de l'étude par une évaluation comparative d'un modèle chirurgical et d'un modèle induit par un agent chimique couramment utilisé en laboratoire de recherche (évaluation du patron de marche et de l'allodynie mécanique secondaire, évaluation histologique, évaluation des concentrations de neuropeptides de la moelle épinière);
- Évaluer les effets analgésiques d'une administration orale quotidienne de deux doses d'eugéno1 (20 et 40 mg/kg) pour une durée de 28 jours chez un modèle murin d'arthrose unilatérale du grasset par une analyse comportementale (évaluation du patron de marche et de l'allodynie mécanique secondaire), biochimique (évaluation des concentrations de neuropeptides à l'intérieur de la région lombaire de la moelle épinière) ainsi qu'une analyse de la progression des lésions tissulaires et des effets cytoprotecteurs potentiels de l'eugéno1 (évaluation histologique);
- Caractériser le profil peptidique associé à la douleur chez le modèle murin d'arthrose unilatérale du grasset induit par l'agent chimique MIA par une analyse biochimique longitudinale rapportant les concentrations de neuropeptides retrouvés à l'intérieur de la région lombaire de la moelle épinière à différents jours suivant l'induction de la pathologie.

7. Hypothèses de recherche

- 1) Une évaluation comparative de la réponse douloureuse des animaux chez deux modèles rats d'arthrose permettra de sélectionner un modèle approprié pour la continuité du projet en fonction des objectifs pré-établis. Le modèle induit par l'agent chimique démontrera une réponse douloureuse rapide et prononcée avec des modifications claires dans le patron de marche des animaux accompagnée de la présence d'allodynie mécanique secondaire dans la patte ipsilatérale;
- 2) L'eugénol agit sur les canaux Ca_v et Na_v ainsi que sur les récepteurs TRPV1 impliqués dans la transmission de l'influx nociceptif. L'expression des récepteurs TRPV1 par les nocicepteurs est augmentée lors de l'arthrose. Donc, l'eugénol devrait diminuer la douleur primaire et secondaire en inhibant l'activité de ces récepteurs chez le modèle expérimental de douleur articulaire associée à l'arthrose.
- 3) Puisque les peptides centraux sont responsables de la perception et de la sensibilisation à la douleur, des changements dans leur contenu spinal en fonction de la progression du processus dégénératif articulaire permettra de quantifier une réponse physiologique de la douleur associée à l'arthrose. Les concentrations des neuropeptides pronociceptifs retrouvés dans la moelle épinière de rats arthrosiques augmenteront dans le temps en suivant la progression de la dégénérescence tissulaire dans l'articulation du genou.

CHAPITRE 2 : ARTICLES

Article 1 :

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2011), with permission from Elsevier. License number : 2625540278347.

Ferland CE^a, Laverty S^b, Beaudry F^a, Vachon P^a, (2011).

Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis

Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 97: pp.603-610.

Faculty of Veterinary Medicine, Departments of ^a Veterinary Biomedicine and ^b Clinical Sciences, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Canada.

1.1. Abstract

The purpose of this study was to compare the gait parameters recorded on the CatWalk and the mechanical sensitivity with von Frey filaments of two putative models of osteoarthritis over a one month period, and to evaluate the effect of celecoxib on these parameters. Animals underwent either a surgical sectioning of the anterior cruciate ligament with partial medial meniscectomy (ACLT+pMMx) to create a joint instability model or received an intra-articular injection of monoiodoacetate (MIA) as a putative inflammatory joint pain model. Animals were assessed for four consecutive weeks and knee joints were then evaluated histologically. Spinal cord lumbar enlargements were harvested for selected neuropeptide analysis (substance P (SP) and calcitonin gene related peptide (CGRP)). With the MIA model, significant changes persisted in selected dynamic gait parameters throughout the study in the injured limb as well as with the von Frey filaments. The ACLT+pMMx model in contrast showed no clear differential response between both hind limbs for both gait parameters and pain-related behavior with von Frey filaments occurred only on the last day of the study. Neuropeptide analysis of spinal cord lumbar enlargements revealed a significant increase in CGRP concentration in both models and an increase in SP concentration only in the MIA model. Histological evaluation confirmed the presence of articular cartilage lesions in both models, but they were much more severe in the MIA model. Celecoxib had an effect on the selected gait parameters at the very beginning of the study and had an important alleviating effect on mechanical allodynia. These results suggest that the MIA model may be more appropriate for the evaluation of short term pain studies and that celecoxib may modulate mechanical allodynia through central sensitization mechanisms.

Keywords: osteoarthritis, pain, gait analysis, mechanical allodynia, neuropeptides, rat.

1.2. Introduction

Knee osteoarthritis (OA) is a leading cause of joint pain due to cartilage degeneration and subchondral bone remodeling. These pathological events result in peripheral and central sensitization of pain pathways leading to impaired function and a diminished quality of life (Dieppe and Lohmander, 2005; Prochazkova et al., 2008). In patients, increased knee joint nociception generates a gait adaptation to minimize pain sensation by lowering biomechanical articular stress in the painful limb. However, the exact molecular events and pathways of joint pain remain incompletely understood. Gait disturbance is easily identified as a breakdown in performance and gait analysis provides insights into the underlying OA progression. Many methods have been employed to identify kinetics and kinematics of locomotor behavior in rodents (Coulthard et al., 2003; Gorska et al., 2007; Simjee et al., 2007; Vincelette et al., 2007; Johnson et al., 2008). The CatWalk, an automated quantitative gait analysis method (Hamers et al., 2001), has been employed for investigations of disturbances in locomotion in small animals. Most studies using this method have assessed rats with spinal cord (Kloos et al., 2005; Koopmans et al., 2005; Hamers et al., 2006; Couto et al., 2008) or sciatic nerve injuries (Deumens et al., 2007; Bozkurt et al., 2008). Moreover, inflammatory pain models in rats have provided detailed information of pain-induced gait adaptations with the use of the CatWalk method (Gabriel et al., 2007).

Several animal models mimicking human OA have been developed to enhance our understanding of this condition. Animal models allow the study of structural changes and the progression of the pathology (Brandt, 2002) but also the biomechanical consequences resulting from pain associated with OA. The assessment of osteoarthritic pain and the understanding of underlying mechanisms could eventually lead to novel therapeutic strategies. It is presently difficult to identify the ideal model for the study of OA nociceptive responses. Consequently, we chose to assess two rodent OA models used in preclinical studies to evaluate gait parameters and pain-related behavior. The surgical sectioning of the anterior cruciate ligament with partial medial menisectomy

(ACLT+pMMx) and the intra-articular injection of monoiodoacetate (MIA) models were evaluated. The ACLT+pMMx model has shown similarities to human OA (Hayami et al., 2006). It is a model based on surgically altered joint mechanics creating joint instability that modifies the magnitude and distribution of joint forces applied to the cartilage surface resulting in progressive joint degeneration (Setton et al., 1999). To our knowledge, no studies have reported gait analysis in this model. On the other hand, intra-articular injection of MIA causes the inhibition of chondrocyte glycolysis, which is mandatory to maintain the structural and functional properties of the articular cartilage (Kalbhen, 1987; VanderKraan et al., 1989). Intra-articular injection of MIA in the rat knee joint induces pathology with similarities to OA (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007; Piscaer et al., 2008). Although its use has been linked with the evaluation of pain behavior in rats (Vermeirsch et al., 1989; Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Pomonis et al., 2005; Ferreira-Gomes et al., 2008) a complete gait analysis of this model has not been reported.

Since the aim of the present study was to assess gait and pain-related behavior in two rodent OA models, an evaluation of both models was performed over a one month period to investigate their use to rapidly evaluate therapeutic drugs in future studies. To do so, the CatWalk system was employed in parallel to pain assessment with von Frey filaments, evaluating secondary mechanical allodynia. We hypothesized that changes in the gait pattern and in the pain-related behavioral response will be observed in both OA models, with an amplified nociceptive response in the ipsilateral affected limb leading to an asymmetry in both pain sensation and gait. To validate our findings, celecoxib a selective COX-2 inhibitor, was administered since it has been shown to relieve pain associated with OA (Steingard-Pedersen et al., 2004; Tannebaum et al., 2004; Pomonis et al., 2005).

Central sensitization with peripheral tissue damage leads to biochemical spinal cord changes seen in receptors, neurotransmitters and neuromodulators. Pain-related neuropeptides are localized in spinal cord central terminals of afferent nerve fibers and their release modulates the nociceptive response (Schaible and Richter, 2004). Following

behavioral evaluations, selected neuropeptides (substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP)) known to participate in OA (Ahmed et al., 1995) were quantified in the lumbar spinal cord of ACLT+pMMx and MIA animals. We hypothesized that the spinal nociceptive neuropeptides content should be increased with OA pain.

1.3. Experimental procedures

1.3.1. Animals

Forty male Sprague–Dawley rats (Charles River, Canada) weighing 180-225 g at the beginning of the study, were used for these experiments. They were acclimatized in a standard laboratory animal environment (fresh filtered air, 15 changes/h; temperature, 21 ± 3 °C; humidity, 40 to 60 %; and light-dark cycle, 12:12-h). Animals were housed in polycarbonate cages (Ancare, Bellmore, NY, U.S.A) on hardwood chip bedding (Beta chip, Northeastern Products Co., Warrenburg, NY, USA) and acclimated for 5 days prior to the initiation of the study. Rats received tap water and a standard laboratory rodent diet (Charles River Rodent chow 5075, St-Constant, QC, Canada) *ad libitum* until the start of the experiments. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

1.3.2. Experimental design

To determine if both models could induce significant gait and pain-related behavioral changes evaluated with the Catwalk and the von Frey filaments, animals were divided randomly into 6 specific experimental groups; surgical model ($n = 8$), intra-articular injection of MIA model ($n = 8$), sham operated group ($n = 3$), intra-articular injection of saline group ($n = 3$) and a negative control group i.e. animals without any insult

($n = 6$). In a second study, we used the MIA model to evaluate the effect of celecoxib ($n = 6$) on both behavioral tests and compared these results to animals ($n = 6$) that received intra-articular MIA and saline by oral administration.

Two weeks prior to the induction of OA, animals were trained three times a week (Monday, Wednesday, Friday) on the CatWalk runway to cross the corridor, uninterrupted, for the gait pattern evaluation. Three complete runs per animal were analyzed. The von Frey evaluations were performed twice a week (Tuesday, Thursday). On the following week, data were collected and analyzed to obtain the baseline values of each animal for each test.

1.3.3. Induction of osteoarthritis

1.3.3.1. ACLT+pMMx surgery

Aseptic surgeries were performed with isoflurane/O₂ inhalation anesthesia. The left limb was shaved and the skin disinfected (povidone-iodine 10 %). With the leg maintained in extension, a median parapatellar skin incision of 1cm was made. The joint capsule was cut medially and the patella was then luxated laterally. The anterior cruciate ligament was transected using a custom-made retrograde cutting hook and a partial meniscectomy of the medial meniscus was performed. An anterior drawer movement was performed to confirm the ligament transection. The patella was reduced and the joint capsule sutured with vicryl 6-0 absorbable sutures. Subcuticular skin sutures were performed using 4-0 vicryl absorbable sutures. To assure a postoperative analgesia, a single subcutaneous injection of 0.05 mg/kg of buprenorphine (Temgesic®, Schering-Plough) was administered immediately after the surgery. The sham surgeries were performed under the same conditions. After the skin incision, the patella was luxated laterally and put back into place and the skin was sutured.

1.3.3.2. MIA injection

Prior to the MIA intra-articular injections, injections of toluidine blue were performed on dead animals to ensure proper intra-articular injection. For the MIA injection, 8 rats were anaesthetized with isoflurane, the left knee area was shaved and the skin was disinfected with povidone-iodine 10 %. A single intra-articular injection of 3mg sodium iodoacetate (SigmaUltra, 19148-5G) in 30µl of saline was done through the patellar ligament of the left knee using a 1 cc syringe with a 25G needle. The dose of iodoacetate was selected based on previous studies (Beyreuther et al., 2007; Pomonis et al., 2005; Ferreira-Gomes et al., 2008; Schuelert et al., 2008). The animals recovered for two days prior to the initiation of the study. For the negative control group, saline injections were performed in a similar fashion.

1.3.3.3. Celecoxib-treated animals

To evaluate if gait changes were related to pain and inflammation a celecoxib-treated group was used. We hypothesized that knee pain would change the gait pattern since limping, induced by the unilateral lesion, would alter gait parameters differently between the right and left limb. Since this was only observed with the MIA model, it was selected to evaluate the effect of celecoxib ($n = 6$ animals). After receiving an intra-articular injection of MIA, these animals received a 30 mg/kg daily dose of celecoxib (Gentès&Bolduc, Canada) by oral administration for the complete duration of the study (28 days). Six animals with a MIA intra-articular injection received saline by gavage and were used as controls. Treatments were performed by a separate person uninformed of the substance being administered so that the behavioral evaluations were performed blinded.

1.3.4. Gait analysis

Gait analysis was performed using the CatWalk method, which has previously been described (Vrinten and Hamers, 2003; Hamers et al., 2006; Deumens et al., 2007). Briefly, it consists of a fluorescent light tube placed along a glass plate runway. Light enters the

long edge of the glass and the rays are internally reflected except for the areas where the animal is in contact with the plate. Underneath the runway a video camera captures, records and sends the illuminated area images to a computer software. All analyses were performed with a pixel threshold value of 40 arbitrary units with a possible range between 0-255. To enhance animal motivation, Bacon Softies (# S3580-1, Bio-Serv, NJ) were placed at the end of the corridor in an open box joined to black PVC tubing (diameter 4 inches). Furthermore, animals were food deprived the night prior to the CatWalk tests. Following the training period, all animals crossed the walkway, uninterruptedly, and with a constant speed. Since variation in speed locomotion may affect gait parameters (Koopmans et al., 2007), it was minimized by using the mean of three quality runs per animal. Velocity was calculated by dividing the distance crossed by the animal in the corridor with the time taken to complete the distance.

1.3.4.1. Gait parameters

Mean daily reported gait parameters are from 3 corridor crossings prior and post OA induction. To measure pain-related behavioral response, the temporal phenomena of steady-state locomotion such as stepcycle phases of an individual limb were analyzed. The swing phase duration (s) is the time that the paw is not in contact with the ground in a complete stepcycle. Goals to be met in this phase of the stepcycle are to transfer and position the limb to start another stepcycle and the distance covered by the swing phase is directly related to the speed of the stepcycle. The swing speed (m/s) parameter is computed by dividing the stride length by the swing phase duration. The duty cycle (%) is the ratio between the stance duration and the complete stepcycle duration.

1.3.5. Assessment of pain behavior

Mechanical allodynia was assessed by measuring hind paw withdrawal thresholds in response to the application of von Frey filaments. Animals were placed in a Plexiglass chamber with a plastic floor with holes through which filaments are inserted and applied to

bending at the plantar surface of the paw (Pitcher et al., 1999). A period of ten minutes was allowed for the animal to acclimatize prior to the start of the daily evaluations. Mechanical sensitivity was assessed with the use of ten filaments with bending forces of 0.37 to 19.78 g applied first to the contralateral and then to the ipsilateral hind paws, beginning with the lowest force. The filaments were applied only when the animal was standing still on all four paws. Filaments were held for 3 s and this procedure was repeated 3 times with a 5 s rest in between each trial. If the animal didn't respond to the applied hair, the response was considered negative and the next larger filament was employed. If the animal flinched its paw, usually more than once, then the response was noted as positive. A positive response with a given filament for 3 trials determined the paw withdrawal threshold (PWT). If there was no response with the strongest force applied, this value was assigned as the threshold.

1.3.6. Histology of knee joints

On the day following the last behavioral evaluations, rats were anaesthetized with isoflurane and sacrificed by a section of the cervical spine. Knee joints were also collected for histological evaluations to confirm the presence of articular lesions. Knee joints were dissected free of muscle and fixed in a 10% formaldehyde solution (Fisher Scientific, NJ) for 48 h and transferred into a decalcification buffer, pH 7.3, containing 20 % EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma, St Louis, MO) for 14 days. Afterward, the joints were rinsed with tap water and placed in 10 % formaldehyde solution for a maximum of 48 h prior to paraffin embedding. Coronal sectioning was performed and paraffin sections of 4 μm were collected and stained with Safranin O-fast green (SOFG) to evaluate cartilage proteoglycans. Sections were mounted and photographed with a Nikon camera.

1.3.7. Neuropeptide analysis

On the same day of knee joint collection, spinal cord lumbar enlargement collection was done by flushing the vertebral canal with saline following transections of the vertebral column at the L5-L6 level as well as the cervical spine. Obtaining spinal tissue was rapidly

performed (within 1 min) of placing the animal in the anesthesia induction box (isoflurane gas was used). The nervous tissue was immediately frozen (-60 °C) and stored at -80 °C pending analysis. For peptide analysis, the tissues were weighed frozen and homogenized following the addition of 0.25 % TFA solution at a ratio of 1:5 (w:v). Samples were sonicated for 15 min and 200 µL of the homogenate was mixed with 200 µL of tylosine in acetonitrile. Samples were then vortexed and centrifuged at 12 000 g for 10 min and the supernatant was kept and chromatographed using a microbore C8 10 x 1 mm column and a 19 min linear gradient. Selected spinal cord peptides, SP and CGRP were identified based on full scan MS/MS spectra and quantification was performed in selected reaction monitoring (SRM). The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The detailed method has been previously published (Beaudry et al., 2009).

1.3.8. Statistical analysis

For the analysis of gait parameters, each animal served as its own control. To normalize the data, all parameters were calculated as a percentage of respective pre-OA induction values. For each parameter, a mean of 3 assays per animal was calculated and divided by the baseline value giving a relative change in percentage ($[\text{time point value} / \text{mean baseline value}] \times 100$). This calculation allowed the parameter of each animal to be compared to its own baseline to assess group trends over time. To compare differences between both hind limbs in each group at each time point with the baseline values and to identify differences between groups at each time point, repeated measures analysis of variance (linear model) with time and hind limb or group as representative factors were performed, followed with a Bonferroni sequential correction to allow for the numerous comparisons. To analyze von Frey results statistics used are paired independent t-tests, comparing post injection or surgery values to baseline controls with or without treatments. Data are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM). SAS version 9.1 (Cary, N.C.) was used for the statistical analyses.

1.4. Results

1.4.1. Animals

Animals recovered quickly after the MIA injection and the surgeries. The wound healed normally within a few days following the ACLT+pMMx surgery. Swelling of the knee was present in both models for the first 5-6 days only. No significant difference in body weight was observed between all groups and animals had a normal weight gain during the study (data not shown).

1.4.2. Histological evaluation

Control animals had normal articular surfaces and underlying subchondral bones with a homogenous staining of the cartilage matrix (Fig. 1A). In the joints of ACLT+pMMx animals, there was a minimal loss of cartilage proteoglycans and chondrocytes. Variable erosion of the hyaline cartilage occurred in the lateral femoral condyle accompanied by a decrease of superficial SOFG staining on the medial tibial plateau (Fig. 1B). Formation of focal cartilage lesions represents an early event in the progressive disease process. In comparison, MIA injected joints had a much greater structural destruction and disorganization. Complete erosion of the hyaline cartilage on both the femoral and tibial surfaces was observed. Additionally, a remodeling of the subchondral bone was evident with the presence of osteophytes (Fig. 1C). In both models, no articular lesions were observed in the contralateral joints (data not shown). MIA animals that were treated with celecoxib showed a similar articular damage to the MIA animals without treatment (data not shown).

1.4.3. Gait analysis for both MIA and ACLT+pMMx models

1.4.3.1. Velocity

There were no significant differences observed between the group velocity at each time point and no significant differences between initial measurements at baseline and between each group at each time point. Means of speed of all days combined were 37 (\pm 2.17), 38 (\pm 2.17), 41 (\pm 2.51) and 39.17 (\pm 5.84) cm/s for the ACLT+pMMx, MIA, control and celecoxib groups respectively ($P = 0.47$).

1.4.3.2. Gait parameters

Since no differences in gait parameters were seen in different control groups, results from animals without any insult and shams (saline-injected and sham operated knee) were pooled together for comparison with OA model results. When comparing the ipsilateral to the contralateral limbs, obvious differences in strategies were observed between the two OA models (Fig. 2).

With the MIA model (Fig. 2A, top left figure), a significant progressively longer swing phase duration of the ipsilateral limb, and a shorter swing phase duration for the contralateral hind limb, was observed throughout the study ($P < 0.02$), with the exception of day 8 where it is similar for both hind limbs ($P = 0.08$). The swing phase duration of the ipsilateral hind limb significantly increased by the third week compared to the control group ($P < 0.0001$). In the ACLT+pMMx model (Fig. 2, top right figure), there were no significant differences in the swing phase duration when comparing both hind limbs. However, the swing phase duration of both limbs was greater at the beginning of the study and was shorter by the end of the study ($P < 0.0001$) when comparing to controls.

With the MIA model, the swing speed of the ipsilateral limb was significantly slower when compared to the contralateral limb ($P < 0.02$), with the exception of day 8 where both limb were similar ($P = 0.07$) and the contralateral hind limb swing speed was

increased ($P < 0.0001$) (Fig. 2, middle left figure). The ipsilateral affected limb became progressively slower suggesting a progressive degenerative process. With the ACLT+pMMx model, no statistical differences were observed between both hind limbs ($P > 0.02$) (Fig. 2, middle right figure). When compared to the control group, the ACLT+pMMx model swing speed of both hind limbs was significantly greater at the end of the study ($P < 0.002$).

The duty cycle was significantly smaller in the ipsilateral compared to the contralateral hind limb with the MIA model ($P < 0.02$) (Fig. 2, bottom left figure) with the exceptions seen on days 8 and 12. A longer stance phase in the contralateral limb is present in this model. No significant differences were observed in the duty cycle between both hind limbs in the ACLT+pMMx model (Fig. 2, bottom right figure), with the exception of day 1 where it was significantly higher on the contralateral side ($P < 0.002$).

1.4.4. Secondary mechanical allodynia for both MIA and ACLT+pMMx models

The MIA model showed an increased pain response in the injured limb with the von Frey filaments. The mean value of the ipsilateral hind PWT was significantly lower than the contralateral hind paw at each time point ($P < 0.01$) except on day 9 (Fig. 3A). Responses in the contralateral limb remained near the baseline values throughout the study. Conversely, the ACLT+pMMx model showed no evidence of a painful response (Fig. 3B) except for the last evaluation day ($P < 0.05$) when compared to the pre-operative evaluation. No significant differences were observed between the two hind paws at each time point.

1.4.5. Effect of celecoxib on gait analysis and secondary mechanical allodynia using the MIA model

Since the MIA model showed a clear differential effect between hind limbs, on gait and mechanical allodynia, this model was chosen to evaluate the effect of celecoxib treatment.

With celecoxib treatments (Fig. 4), differences were noted only on days 1 and 3 post MIA-induction for the swing speed and the duty cycle when compared to controls ($P < 0.02$). When considering all parameters, there is a trend over the first half of the study so that differences between right and left hind limbs are less pronounced for all parameters.

Celecoxib treatments relieved secondary mechanical allodynia ($P < 0.001-0.03$) (Fig. 5) however no significant differences were observed on days 18 and 23 when compared to MIA animals treated with saline only.

1.4.6. Substance P and CGRP lumbar spinal cord concentrations

Selected peptide concentrations in the lumbar enlargement of the spinal cord are provided in Table I. Compared to controls, SP concentrations were significantly increased in the MIA model with and without celecoxib treatment ($P < 0.01$ and 0.02 , respectively). No significant difference in SP concentration occurred in the ACLT+pMMx model. The concentration of CGRP was significantly increased in both OA models in comparison to the control group ($P < 0.01$) but not in the MIA animals treated with celecoxib.

1.5. Discussion

Two rodent models of OA were investigated to assess the gait disturbances and pain responses as they may serve as models for human joint pain response. The MIA model demonstrated clear pain-related behavioral responses in the injured limb as well as

significant differences between both hind limbs in the dynamic gait parameter evaluation with the CatWalk. The gait pattern differences were compatible with unilateral knee lesion, marking clear limping gait due most probably to an unwillingness of the animals to bear weight on the ipsilateral limb, also observed in human OA compensatory gait mechanics (Kaufman et al., 2001). The flexion-extension phase of the injured knee joint, during the swing phase to move the limb forward, might be decreased because of reduced joint mobility caused by pain. This has been suggested to occur in the case of unilateral knee arthritis in humans (McGibbon and Krebs, 2002). The injured knee joints of the animals under study may have a diminished knee flexion velocity and a reduced knee torque due to a willingness to lock the joint range of motion in order to minimize their sensation of pain.

The ACLT+pMMx model revealed a much less marked pain-like behavioral response on assessment of the dynamic parameters. With an increased swing phase duration and a decreased swing speed occurring in both hind limbs in a parallel fashion, quicker and shorter steps were made in order to maintain a constant speed, which was different to the strategy adopted by the MIA group. A post-surgical recovery period was permitted to avoid data collection in the presence of surgical induced residual inflammation. Results obtained indicate an amplified pain response on day 1 that could still be related to surgical trauma. An interesting finding is that this amplified response is observed in both hind limbs. In the presence of persisting inflammation, central sensitization via peripheral nociceptor activation may occur. Inflammatory processes may alter the sensory input to the spinal cord and subsequent changes in the contralateral output may occur, inducing a bilateral pain response (Decaris et al., 1999; Schenker et al., 2003; Kelly et al., 2007).

Two published investigations of rat OA models have been conducted with the CatWalk method, with one assessing the paw print intensity only (Ferreira-Gomes et al., 2008). Angeby-Möller et al. (2008) observed a reduced duration of the stance phase in the injected paw of the monoarthritic carrageenan rat model. It is difficult to compare their findings with the two OA models used in the study herein as the mechanisms of action underlying the method of disease induction differ. The carrageenan model produces a

localized synovial inflammatory response with symptoms of joint pain that peak 3-4 h post-injection (Tonussi and Ferreira, 1992). The MIA model in contrast, produces a pain response in the days following injection in a dose-dependant manner (Bove et al., 2003; Kobayashi et al., 2003). Furthermore, the temporal behavioral pattern of the MIA model is known to be biphasic (Guingamp et al., 1997), implying a transient synovial inflammation (Fernihough et al., 2004) post injection followed by an increase in pain-related behavioral response within the first days. The second phase has been reported to occur by day 7 post injection resulting of structural changes in the joint associated with pain-related response (Bove et al., 2003). Results shown in figures 1 and 2 are in accordance with the work of Bove et al. (2003), since on day 8 no differences were observed between the ipsilateral and contralateral limbs in this model. As for the ACLT+pMMx model, it reproduces progressive OA longer than the four weeks period considered in the study herein as suggested with the histological observations and Catwalk results.

Secondary mechanical allodynia measured with the von Frey filaments occurred in the ipsilateral hind paw of the MIA model with a significantly lowered threshold identified on the first day of testing through the end of the study (except for day 9) combined with an almost unchanged threshold on the contralateral side. No significant allodynia was observed in the ACLT+pMMx model except for the last evaluation at the end of the study. This also suggests that this model needs a longer time to develop and a one month study appears insufficient to show significant finding. Central sensitization may play a major role in progression to chronicity (Coutaux et al., 2005), often observed in patients with progressive OA (Poole et al., 2007).

Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, was administered since it has been shown to relieve pain associated with OA (Steingard-Pedersen et al., 2004; Tannebaum et al., 2004; Pomonis et al., 2005). Our results show that an effect on swing speed and the duty cycle only was observed at the beginning of the study suggesting that this drug appears to work in the inflammatory phase but not in the chronic pain phase in the MIA model however the secondary mechanical allodynia was decreased during the study except for the last days of

the study (18 and 23). These results would tend to suggest that central sensitization is relieved with celecoxib but not local pain occurring from the affected articulation.

The histological assessment confirmed the presence of articular structural changes in both models. Advanced degenerative articular lesions were seen only in the MIA model joints with a remodeling of the subchondral bone structure greatly associated with pain (Guzman et al., 2003) and therefore might be responsible for the generation of the greater pain response found in this model. The ACLT+pMMx model revealed early events of the OA pathology with only focal cartilage lesions identified. As hyaline cartilage is not innervated, other articular structures are responsible for generating the behavioral pain response. The instability caused by ligament damage results in greater joint displacements and more abrupt motion than would occur in a stable joint and consequently may excite spinal cord neurons responding to noxious mechanical stimuli by stimulation of deep articular tissue (Schaible et al., 2006).

Selected pain-related peptides were assessed only at the end of the study. Neuropeptide synthesis is enhanced during OA progression and spinal cord production of these peptides is an important factor modifying the process of signal transmission and modulation of central mechanisms of pain (Niissalo et al., 2003). Substance P and CGRP, coexisting in small-diameter afferent fibres, have been found to directly participate in the injury-induced neuroplasticity changes in arthritis (Ahmed et al., 1995; Garrett et al., 1995; Keeble and Brain, 2004; Bird et al., 2006). The concentrations of both neuropeptides were increased in both OA models suggesting that excitatory neurotransmission initiated long term changes at the central level. However, only CGRP was significantly increased in the ACLT-pMMx model. In this model, the SP concentration was increased but it is not significantly different from the control group. The high variability was brought about by one animal where a very low SP concentration was measured (in comparison to other animals). In the MIA model both peptides were significantly increased. Interestingly SP was still elevated with celecoxib treatment but CGRP concentrations were within normal limits (animals without pain). Since allodynia was decrease with celecoxib these results

suggest that CGRP is an important peptide for central sensitization in OA. The importance of CGRP in OA pain transmission has previously been reported by Schaible et al. (2006). It would be interesting to establish a neuropeptide concentration profile at various time points in OA animal models to demonstrate variations in the time course of pain-related neuropeptide expression with progression of joint injury.

In summary, we compared the gait and pain-like behavioral responses in two different OA models in rodents frequently employed in preclinical studies. Our results suggest that the differences observed between both models could be related to distinctive knee lesions inducing different nociceptive mechanisms. Furthermore, when a relatively short study is required, the MIA model may be a better model for the evaluation of therapeutic strategies for joint pain palliation, having clear behavioral nociceptive responses in the gait parameters of the injured limb. Longer experiments need to be performed to better characterize the ACLT+pMMx model. Modifications of the nociceptive processing within the spinal cord have been identified and further investigations are required to better characterize their role in the development of pain sensitization.

1.6. Acknowledgements

The authors would like to thank Marie-Thérèse Parent for the preparation of the figures, Hélène Richard for technical assistance with histological procedures, and Dr Guy Beauchamp for the statistical analyses. Catherine E. Ferland is a recipient of a Canadian Arthritis Network/ The Arthritis Society trainee award and is funded by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

1.7. References

- Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg, Theodorsson E, Kreicbergs A. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant-arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum* 1995;38:699-709.
- Ängeby-Möller K, Berge OG, Hamers FPT. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and rofecoxib. *J Neurosci Methods* 2008;174 :1-9.
- Beaudry F, Ferland CE, Vachon P. Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2009; 23:940-50.
- Bird GC, Han JS, Fu Y, Adwanikar H, Willis WD, Neugebauer V. Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Molecular Pain* 2006; 2:31.
- Beyreuther B, Callizot N, Stöhr T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:1-8.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS: Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11:821-30.
- Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O'Dey DM, Weis J, Joosten EA, Führmann T, Brook GA, Pallua N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods* 2008;173:91-8.
- Brandt KD. Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* 2002; 39:221-35.

Coulthard P, Simjee SU, Pleuvry BJ. Gait analysis as a correlate of pain induced by carrageenan intraplantar injection. *J Neurosci Methods* 2003;128:95-102.

Couto PA, Filipe VM, Magalhães LG, Pereira JE, Costa LM, Melo-Pinto P, Bulas-Cruz J, Mauricio AC, Geuna S, Varejão ASP. A comparison of two-dimensional and three-dimensional techniques for the determination of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats following spinal cord injury. *J Neurosci Methods* 2008;173 :193-200.

Decaris E, Guingamp C, Chat M, Philippe L, Grillasca JP, Abid A, Minn A, Gillet P, Netter P, Terlain B. Evidence fro neurogenic transmission inducing degenerative cartilage damage distant from local inflammation. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1951-60.

Deumens R, Jaken RJP, Marcus MAE, Joosten EAJ. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods* 2007;164 :120-30.

Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 2005; 365: 965-73.

Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004; 112: 83-93.

Ferreira-Gomes J, Adães S, Castro-Lopes JM. Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and catwalk tests: A clinically relevant study. *J Pain* 2008; 9:945-54.

Gabriel AF, Marcus MAE, Honig WMM, Walenkamp GHIM, Joosten EAJ: The CatWalk method. A detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods* 2007;163 :9-16.

Garrett NE, Kidd BL, Cruwys SC, Tomlinson DR. Changes in preprotachykinin mRNA expression and substance P levels in dorsal root ganglia of monoarthritic rats: comparison with changes in synovial substance P levels. *Brain Res* 1995; 27:675:203-7.

Gorska T, Chojnicka-gittins B, Majczynski H, Zmyslowski W. Overground locomotion after incomplete spinal lesions in the rat: Quantitative gait analysis. *J of Neurotrauma* 2007; 24:1198-1218.

Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 200331:619-24.

Hamers FPT, Koopmans GC, Joosten EAJ. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23:537-48.

Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispen WH. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: Its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma* 201; 18:187-201.

Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong le T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 2006; 38:234-43.

Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, Westwood FR, Murray F, Read SJ. Structural

pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 2007; 128:272-82.

Johnson WL, Jindrich DL, Roy RR, Reggie Edgerton V. A three-dimensional model of the rat hindlimb: Musculoskeletal geometry and muscle moment arms. *J Biomech* 2008;41:610-9.

Kalshen DA. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 1987; 14:130-31.

Keeble JE, Brain SD. A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett* 2004; 6; 361:176-79.

Kelly S, Dunham JP, Donaldson LF. Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. *Eur J Neurosci* 2007; 26:935-42.

Kloos AD, Fisher LC, Detloff MR, Hassenzahl DL, Basso DM. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2005; 191:251-65.

Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, Tanaka H, Goda M, Fukunari A, Komatsu H. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci* 2003; 65:1195-99.

Koopmans GC, Deumens R, Honig WMM, Hamers FPT, Steinbusch HWM, Joosten EAJ. The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: The importance of objective analysis of coordination. *J Neurotrauma* 2005; 22:214-25.

Koopmans GC, Deumens R, Brook G, Gerver J, Honig WMM, Hamers FPT, Joosten EAJ. Strain and locomotor speed affect over-ground locomotion in intact rats. *Physiol Behav* 2007; 92:993-1001.

McGibbon CA, Krebs DE. Compensatory gait mechanics in patients with unilateral knee arthritis. *J Rheum* 2002; 11:2410-9.

Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Konttinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2002; 966:384-99.

Piscaer TM, Waarsing JH, Kops N, Pavljasevic P, Verhaar JA, van Osch GJ, Weinans H. In vivo imaging of cartilage degeneration using microCT-arthrography. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16:1011-17.

Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J Neurosci Methods* 1999;87:185-93.

Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 2005; 114:339-46.

Poole AR. Etiopathogenesis of OA, in Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*, Fourth Edition. W.B. Saunders, Philadelphia, USA, 2007; 27-49

Prochazkova M, Zanvit P, Dolezal T, Prokesova L, Krsiak M. Increased gene expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during experimental osteoarthritis pain. *Physiol Res* 2008; 58:19-25.

Schaible HG, Richter F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg* 2004;389:237-43.

Schaible HG, Schmelz M, Tegeder I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58:323-42.

Schenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology* 2003; 42: 1279-86.

Schuelert N, McDougall JJ: Cannabinoid-mediated antinociception is enhanced in rat osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 2008; 58:145-53.

Setton LA, Elliott DM, Mow VC. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7:2-14.

Simjee SU, Jawed H, Quadri J, Saeed SA. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R91.

Stengaard-Pedersen K, Ekesbo R, Karvonen AL, Lyster M. Celecoxib 200 mg q.d. is efficacious in the management of osteoarthritis of the knee or hip regardless of the time of dosing. *Rheumatol* 2004; 43:592-95.

Tannenbaum H, Berenbaum F, Reginster JY, Zacher J, Robinson J, Poor G, Bliddal H, Uebelhar D, Adami S, Navaro F, Lee A, Moore A, Gimona A. Lumiracoxib is effective in the treatment of osteoarthritis of the knee: a 13 week, randomized, double-blind study versus placebo and celecoxib. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1419-26.

Tonussi CR, Ferreira SH. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test : an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 1992;48:421-27.

Van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LB, van den Berg WB. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol* 1989; 135:1001-14.

Vermeirsch H, Biermans R, Salmon PL, Meert TF. Evaluation of pain behavior and bone destruction in two arthritic models in guinea pig and rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87:349-59.

Vincelette J, Xu Y, Zhang LN, Schaefer CJ, Vergona R, Sullivan ME, Hampton TG, Wang YX. Gait analysis in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R123.

Vrinten DH, Hamers FPT. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 2003; 102:203-9.

1.8. Figure legends

Figure 1. Complete femorotibial joint sections stained with SOFG. Normal 16 week old femorotibial joint (A). ACLT+pMMx model 4 weeks post surgery. Ulceration of articular cartilage on the lateral femoral condyle and loss of SOFG stain on the medial tibial plateau are observed (arrows) (B). MIA model 4 weeks after injection. Complete loss of articular cartilage and extensive bone remodeling are observed (C). Scale bar = 2.5 mm.

Figure 2. Gait parameters obtained from the CatWalk analysis for both OA models. Variations in the ipsilateral and contralateral hind limbs of the swing phase duration (Top), swing speed (Middle) and duty cycle (Bottom) for both the MIA model and the ACLT+pMMx model. Results from control animals are represented as the dotted lines. All parameters are expressed as a % of the baseline values. Data are presented as Mean \pm SEM. With the MIA model significant differences are present for all three gait parameters ($P < 0.02$) except for the swing phase duration and swing speed on day 8 and the duty cycle on days 8 and 12. With the ACLT+pMMx model the only significant difference was noted on day 1 of the duty cycle ($P < 0.002$). Data are presented as Mean \pm SEM. Statistics used are mixed linear model ANOVA and Bonferroni sequential correction.

Figure 3. Paw withdrawal threshold (g) evaluated with the von Frey hair test of the ipsilateral and contralateral hind limbs of the MIA model (A) and ACLT+pMMx model (B). Data are presented as Mean \pm SEM. * = significant difference between the two hind limbs ($P < 0.007$). Statistics used are paired independent *t*-test compared to controls.

Figure 4. Effect of celecoxib and saline treatments on gait parameters in the MIA model. Differences (%) between the right and left hind legs for swing phase duration (Top), swing speed (Middle) and duty cycle (Bottom) are presented. Differences were noted only on days 1 and 3 post MIA-induction for the swing speed and the duty cycle when compared to controls ($P < 0.02$). Data are presented as Mean \pm SEM. Statistics used are mixed linear model ANOVA and Bonferroni sequential correction.

Figure 5. Effect of celecoxib and saline treatments on von Frey paw withdrawal threshold of the ipsilateral hind limb using MIA model. Thresholds are expressed in grams. Data are presented as Mean \pm SEM. Celecoxib treatments relieved secondary mechanical allodynia ($P < 0.001-0.03$) except on days 18 and 23. Statistics used are paired independent *t*-test compared to controls.

Table I

Mean (\pm SD) neuropeptides concentrations (pmol/g) in lumbar spinal cord enlargement at four weeks in controls, post OA induction and MIA animals with celecoxib treatment. Significant differences from the control group identified as ¹ ($P < 0.01$) and ² ($P < 0.02$).

	Control	ACLT+pMMx	MIA	MIA+Celecoxib
Substance P	67.6 (\pm 57.3)	226.3 (\pm 180.0)	190.2 (\pm 83.8) ¹	216.4 (\pm 109.0) ²
CGRP	2541 (\pm 293)	4651 (\pm 1653) ¹	4561(\pm 1413) ¹	1850 (\pm 514)

Figure 1

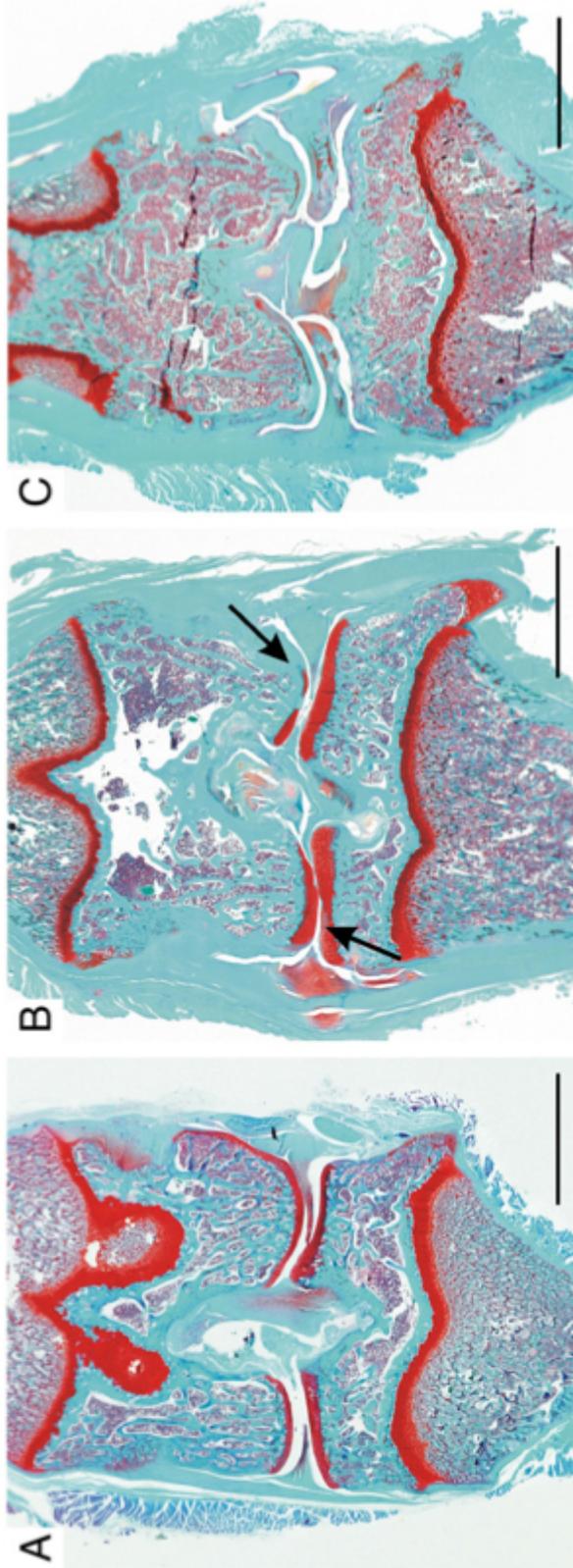


Figure 2

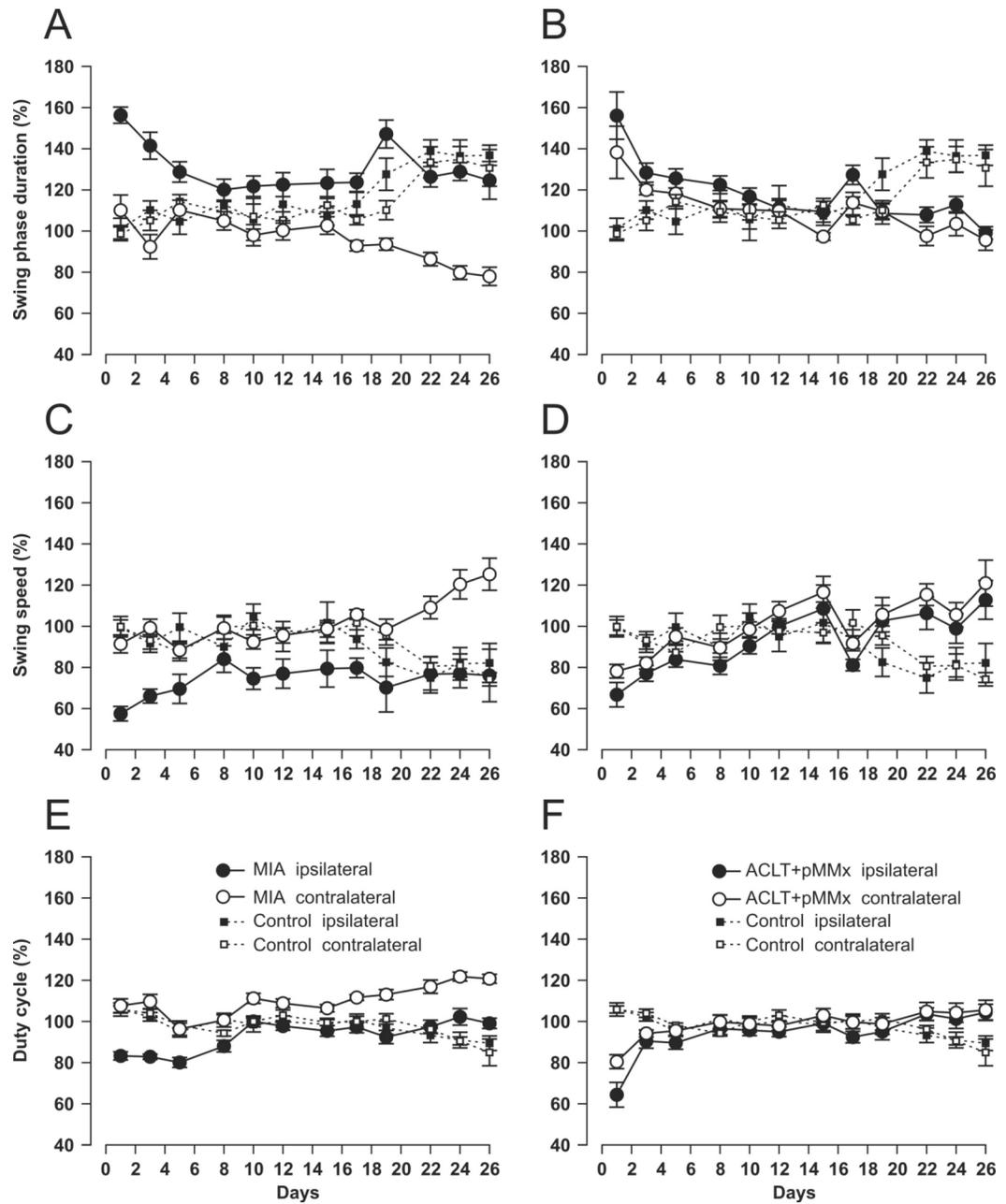


Figure 3

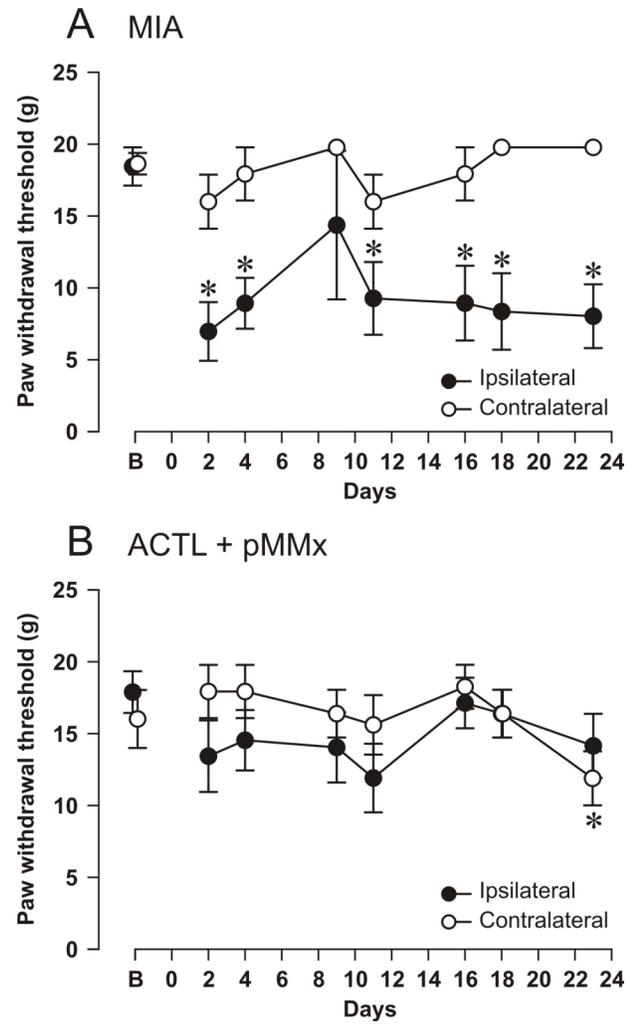


Figure 4

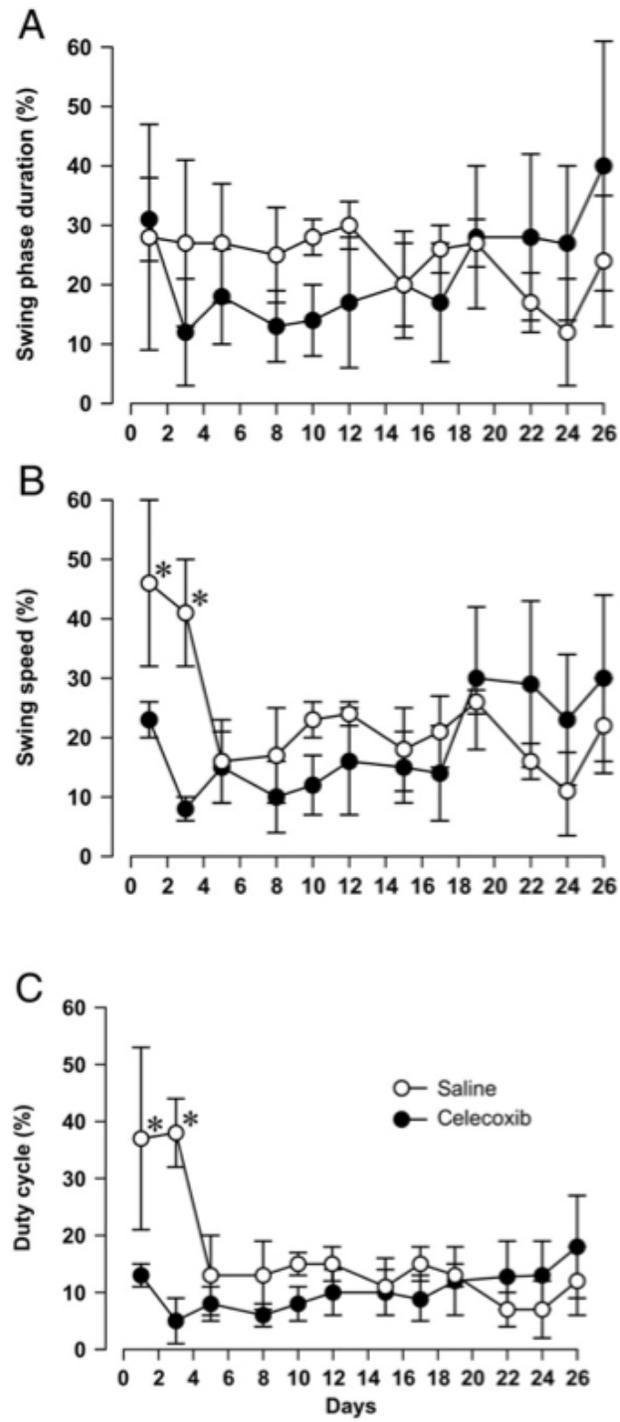
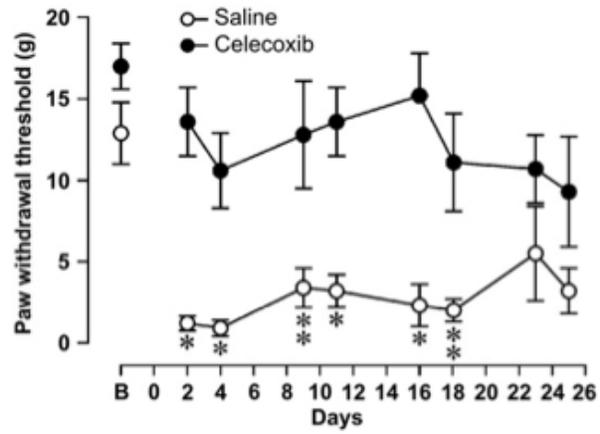


Figure 5



Article 2 :

Catherine E. Ferland, Francis Beaudry, Pascal Vachon (article soumis, 2011).

Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Canada.

2.1. Abstract

Joint pain is a major clinical symptom associated with osteoarthritis. The increasing number of reports of ineffective pharmacological treatments or side effects has encouraged the search for alternative treatments to alleviate osteoarthritis-related pain. The aim of the present study was to evaluate whether eugenol, the main constituent of clove oil, has the capacity to provide analgesia in the monoiodoacetate-induced rat model. Animals ($n = 6$ /group) received either eugenol (20 or 40 mg/kg) or a vehicle by gavage. Daily administrations were initiated two days post osteoarthritis induction and continued for the duration of the study (4 weeks). Gait analysis was performed using the CatWalk method and secondary mechanical allodynia was assessed with von Frey filaments. Following, selected spinal cord peptides (substance P, calcitonin gene-related peptide and dynorphin) were quantified by mass spectrometry. Significant changes were identified in dynamic gait parameters (swing speed, swing phase duration and duty cycle) of the affected limb following 40 mg/kg eugenol treatment when compared to the vehicle ($P < 0.05$). Von Frey results revealed significant differences between the 40 mg/kg treatment and the vehicle group during the first and the third week ($P < 0.02$) of the study. Four weeks post osteoarthritis induction, spinal pain-related peptide analysis revealed a decreased content of substance P and CGRP accompanied by an increase of dynorphin in animals treated with 40 mg/kg eugenol. These results coupled with the lack of evidence of systemic ill effects after repeated treatments suggest the therapeutic potential of eugenol to alleviate osteoarthritis-related pain.

Keywords: Eugenol, pain, osteoarthritis, gait analysis, neuropeptides, rat.

2.2 Introduction

Osteoarthritis is a chronic joint disease and the major clinical symptom associated with it is pain during motion, diminishing the quality of life (Dieppe et Lohmander, 2005). Presently, pharmacological therapies remain insufficient to alleviate pain and are associated with safety and tolerability issues (Hellio Le Graverand-Gastineau, 2009). There is a pressing need for alternative treatments with fewer side effects and natural plant extracts are an interesting option considering the recent interest shown by the general population in natural products.

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), the main constituent of clove oil, is commonly used in dentistry as a local analgesic (Ohkubo et Shibata, 1997). The biphasic pharmacological actions of eugenol (initial pungent effect followed by a delayed analgesia) and its chemical structure similar to capsaicin suggest that these two molecules act via the same receptor, the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) (Yang et al., 2003). The analgesic effect of eugenol is also related to its ability to inhibit the activation of pain-related high voltage calcium (Lee et al., 2005) and sodium channels (Cho et al., 2008), suggesting that eugenol may therefore modulate osteoarthritis-related pain by acting on different receptors that play a role in nociception.

Peripheral tissue injury leads to central neurogenic changes affecting nociceptive signal transmission and modulation. Neurotransmitters are found in the spinal cord to either activate the neurons of the dorsal horn or regulate the descending output of the postsynaptic neurons. Substance P and the calcitonin gene-related peptide (CGRP) are two pronociceptive peptides known to participate in osteoarthritis and are quantifiable biomarkers of pain (Ahmed et al., 1995; Beaudry et al., 2009). A measurement of their concentrations in nervous tissues or cerebrospinal fluid may be a valuable indicator of the antinociceptive effect of pain modulators. Furthermore, spinal endogenous opioid peptides release is increased in neuropathic and chronic pain states (Lai et al., 2001) and may promote the release of pronociceptive peptides (Gardell et al., 2002). Other peptides may

also be related to pain, but in the present study we focused on substance P, CGRP and dynorphin, an endogenous opioid acting on the kappa receptors (Goldstein et al., 1979).

The aim of the present study was to evaluate the antinociceptive effects of eugenol in an experimental rat model of osteoarthritis, with repetitive daily administration over a one month study period. An intra-articular injection of monoiodoacetate (MIA) was performed, causing the inhibition of glycolysis in chondrocytes, leading to cartilage degeneration (Kalbhen, 1987). The MIA model has been reported to be a putative model for the study of joint pain (Fernihough et al., 2004) by mimicking features associated with osteoarthritis-related pain in humans (Combe et al., 2004). Since gait disturbances are known consequences of pain during motion, an analysis of various gait parameters was performed in parallel to the evaluation of secondary mechanical allodynia. Spinal cord concentrations of selected pain-related peptides were evaluated at the end of the treatment period as indicators of the pain response.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Animals

Twenty-three male Sprague Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada) weighing 200-225 g at the beginning of the study were used for these experiments. Animals were kept in a standard laboratory environment. Rats received tap water and a standard laboratory rodent diet (Charles River Rodent chow 5075, St-Constant, QC, Canada) *ad libitum* until the start of the experiments. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Animals were allowed to acclimate for 5 days prior to the initiation of the study.

2.3.2. Experimental design

Two weeks prior to the beginning of the experiments, animals were conditioned and trained on the laboratory apparatus. Training occurred three times a week (Monday, Wednesday, Friday) on the CatWalk runway to cross the corridor uninterrupted and twice a week (Tuesday, Thursday) for the von Frey filaments applications. During the second week of training, data were collected and analysed to obtain baseline values for each animal. Following the training period, animals were randomly separated into different groups and osteoarthritis was induced by an injection of MIA. There were two treatment groups (20 and 40 mg/kg eugenol, p.o.) and a negative control group that received a vehicle solution only, each containing 6 animals. A group of animals without any joint insult (n = 5) was also studied to obtain normal spinal cord concentrations of the studied peptides.

2.3.3. Induction of osteoarthritis

Rats were anaesthetised with 1-2% isoflurane, the left leg was shaved and the skin was disinfected with Povidone-iodine 10%. A single intra-articular injection of 3 mg of sodium monoiodoacetate (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) through the patellar ligament of the left knee in a total volume of 30 µl solution in saline was performed using a 1 cc syringe with a 25G needle. The animals recovered individually and were allowed to rest for two days before beginning behavioural testing. Twenty-four hours post injection, the knee diameter was measured in a medio-lateral orientation to assess swelling progression using a millimetre standard ruler, with caution not to put pressure on the knee joint. The knee diameter was measured daily for one week following the MIA injection.

2.3.4. Eugenol and vehicle treatments

Treatments started two days post osteoarthritis induction. A suspension of solution consisting of 0.5 ml of eugenol 99% (Aldrich E51791), 0.25 ml of cremophor (2.5%), 0.25 ml of ethanol (2.5%) and 9 ml of deionised H₂O was made to final concentration of 50 mg/ml. The solution was prepared daily. Eighteen rats were randomly distributed into three

groups to receive daily oral doses of eugenol either 20 mg/kg (n = 6) or 40 mg/kg (n = 6) and the vehicle solution (n = 6) for the 29 days of the study. Daily eugenol administration occurred one hour prior to the beginning of the behavioural assessment. The order in which the animals were tested differed daily in order to avoid variation due to differences between the time of oral treatment manipulation and the test execution. Treatment administration and behavioural evaluation were performed by two different observers to assure blinded results.

2.3.5. Behavioural studies

2.3.5.1. Gait analysis using the CatWalk

Gait analysis was performed using the CatWalk method (Noldus, VA, USA), which has previously been described (Deumens et al., 2007). Briefly, the CatWalk consists of a fluorescent light tube placed along a glass plate runway. Light enters along the edge of the glass and rays are internally reflected except for the areas where the animal is in contact with the plate. Underneath the runway, a video camera captures, records and sends the illuminated area images to a computer software. All analyses were performed with a pixel threshold value of 40 arbitrary units. To enhance animal's motivation, they were food deprived the night prior to the CatWalk evaluation. Three complete runs per animal and per day were analysed with the CatWalk software (version 7.1).

Mean daily reported gait parameters are from 3 corridor crossings. To measure pain-related behavioural response, the temporal phenomena of steady-state locomotion such as the step cycle phases of an individual limb were analysed. The swing phase duration (s) is the time when the paw is not in contact with the ground in a complete step cycle. Goals to be met in this phase of the step cycle are to transfer and position the limb to start another step cycle. The distance covered by the swing phase is directly related to the speed of the step cycle. The swing speed (m/s) parameter is computed by dividing the stride length by

the swing phase duration. The duty cycle (%) is the ratio between the stance duration and the complete step cycle duration.

2.3.5.2. Von Frey filaments to evaluate secondary mechanical allodynia

Secondary mechanical allodynia was assessed by measuring withdrawal threshold in response to the von Frey filaments. Animals were placed in a Plexiglass chamber with a plastic floor with holes through which filaments are inserted and applied to bending at the plantar surface of the paw. A minimum period of 10 min was allowed for the animal to acclimatize prior to the start of the daily evaluations. Secondary mechanical allodynia was assessed with the use of ten filaments with bending forces ranging from 0.37 to 19.78 g applied to the ipsilateral and contralateral hind paws beginning with the lowest force. The filaments were applied only when the animal was standing still on all four paws. Filaments were held for 3 s and repeated 3 times with a minimum of 5 s rest in between each trial. If the animal flinched once or not at all in response to the applied filament, the response was noted as negative and the next larger filament was used. If the animal flinched its paw more than once, then the response was noted as positive and the paw withdrawal threshold of the animal was determined. If there was no response with the strongest force applied (19.78 g), the force of the latter filament was assigned as the threshold.

2.3.6. Post mortem procedures

Following the behavioural measurement period, the rats were sacrificed 31 days post MIA injection. Under anaesthesia, blood samples were collected for biochemical and haematological profiles. The spinal cord lumbar enlargements were collected for neuropeptide analysis. Selected organs (one cerebral hemisphere, upper lumbar spinal cord, heart, lungs, liver, kidneys, bladder, stomach, large and small intestines, testis, prostate) were collected for histopathological study. Lastly, knee joints were collected for histological evaluation to confirm presence of articular lesions.

2.3.6.1. Spinal cord neuropeptide analysis

A detailed method to measure spinal cord peptides has been previously published (Beaudry et al., 2009). Following retrieval, spinal cord samples were immediately frozen in cold hexane and stored at -80°C pending analysis. The tissues were weighed frozen and homogenised following the addition of 0.25% trifluoroacetic acid solution with a ratio of 1:5 (w:v). Samples were vortexed and centrifuged at 12 000 g for 10 min and the supernatant was transferred into injection vials and 2 µl were chromatographed using a microbore C8 100 x 1 mm column and a 19 min linear gradient at a flow rate of 75 µl/min for a total run time of 32 min. The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The peptides were identified in rat spinal cords based on full scan MS/MS spectra. Substance P, CGRP and dynorphin were predominantly identified by the presence of specific b and y collision induced dissociation fragments. Selected reaction monitoring using mass transitions of 674 → [600+254], 952 → [1215+963] and 717 → [944+630] for substance P, CGRP and dynorphin were used for quantitative analyses.

2.3.6.2. Nervous tissue accumulation of eugenol

To evaluate the potential accumulation of eugenol in the central nervous system, one cerebral hemisphere was collected post mortem to analyse the eugenol concentration by HPLC-ESI/MS/MS in a similar manner as described by Lionnet et al. (2010).

2.3.6.3. Histological preparation and evaluation of knee joints

On the day of sacrifice, knee joints were dissected free of muscle and fixed in a 10% buffered formaldehyde solution (Fisher Scientific, NJ, USA) for 48 h and transferred into a decalcification buffer (pH 7.3) containing 20% ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma, St Louis, MO, USA) for 14 days. Afterward, the joints were rinsed with tap water and placed in 10% buffered formaldehyde solution for a maximum of 48 h prior to paraffin embedding. Coronal sectioning was performed and paraffin sections of 4 µm were collected

and stained with Safranin O-fast green to assess articular cartilage changes. Sections were mounted and graded semi quantitatively with the use of a Leica microscope, and then scored according to modified OARSI histopathology initiative published scales (Lavery et al., 2010). The synovial membrane was evaluated for its hypertrophy (0: normal, 1: light, 2: moderate) and hyperplasia of synoviocytes (0: absence, 1: two layers, 2: 3 and more layers), the stroma for granular inflammation (0: absence, 1: presence) and the cartilage for structural changes (0: normal, 1: erosion, 2: ulceration of the hyaline cartilage, 3: ulceration of the calcified cartilage) and loss of staining of the femoral condyle or tibial plateau (0: uniform staining throughout articular cartilage, 1: 1/3 loss of staining in superficial zone of hyaline cartilage, 2: 2/3 loss of staining of hyaline cartilage, 3: loss of staining in all the hyaline cartilage, 4: loss of hyaline cartilage) and cluster formation (0: absence, 1: presence). These resulting scores generated a maximal score of 13.

2.3.7. Data analysis

Each animal served as its own control and all parameters were normalised and calculated as a percentage of respective pre-osteoarthritis induction values. For each behavioural parameter a mean of 3 assays per animal was calculated and divided by the baseline value giving a percentage value. Differences between right and left hind limbs for all parameters were compared between eugenol treated groups and the vehicle treated group at each time point using repeated measures analysis of variance (linear model) with time and group as representative factors followed with a Bonferroni sequential correction. Secondary mechanical allodynia results were analysed with the use of a Friedman ANOVA with post hoc t-tests. Peptide concentrations were evaluated with paired independent T-tests comparing treatment groups. Histological changes were analysed with a Friedman non-parametric analysis of variance. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for behavioural results and as mean \pm standard deviation (SD) for peptides concentrations. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with the raw values. SAS version 9.1 (Cary, N.C., USA) was used for statistical analyses.

2.4. Results

2.4.1. Animal well being

No signs of apparent ill effects such as abnormal motor behaviour (locomotion, posture), ruffled hair coat, abnormal feces and dehydration were observed with repeated eugenol administration during the study.

2.4.2. MIA model

Joint swelling occurred in all animals following the MIA injection but rapidly resorbed in all animals. At 72 h, knee joint widths were similar to pre-injection values. No significant differences in body weight were observed between groups during the complete period of the study as the animals had a normal weight gain (data not shown).

2.4.3. Behavioural assessment of pain

2.4.3.1. *Effect of eugenol on gait parameters*

There were no significant differences observed between initial velocity at baseline and at each time point for each group and between groups ($P > 0.12$). There were also no differences in mean speed between groups at each time point and for all days combined (43 ± 5.27 , 40 ± 4.80 and 43 ± 3.40 cm/s for the vehicle and eugenol administered at 20 and 40 mg/kg groups respectively ($P = 0.35$)).

Significant differences were observed in the animal's hind limb gait patterns. The speed at which the animals performed the swing phase of the injured limb was decreased in all groups for the complete duration of the testing period. The greatest differences between both hind limb swing speed were observed in the vehicle group (Fig. 1A). The 20 mg/kg treatment group was not different from the vehicle treatment group resulting in similar gait patterns ($P > 0.05$) (Fig. 1B). A significant reduction of the difference ($P < 0.05$) between

both hind limbs was observed at days 10, 13 and 20 in the 40 mg/kg dose of eugenol group, when compared with the vehicle group (Fig. 1C).

The vehicle group demonstrated an increase in the MIA-injected limb swing phase duration, suggesting an avoidance of loading the injured limb (Fig. 1D). This increase resulted in a clear difference between both hind limb swing phase duration for the complete testing period. Animals receiving 20 mg/kg of eugenol had a swing phase duration pattern similar to the vehicle group (Fig. 1E). When animals were treated with 40 mg/kg of eugenol, a significant improvement in the gait pattern (a decreased swing phase duration of the injured limb) (Fig. 1F) was observed on days 3, 10, 13, 17 and 20 post MIA injection when compared with the vehicle group ($P < 0.05$).

In the 20 mg/kg eugenol group, the duty cycle was significantly smaller in the ipsilateral compared to the contralateral limb and was similar to the vehicle group, which showed similar differences between both hind limbs throughout the study ($P > 0.05$) (Fig. 1G and 1H). In the 40 mg/kg eugenol group, a decrease in the duty cycle difference was observed between both hind limbs (longer duty cycle in the ipsilateral limb) when compared to the vehicle group on days 3, 10, 13 and 20 ($P < 0.05$) (Fig. 1I), showing duty cycles closer to pre-MIA injection baseline values.

2.4.3.2. Effect of eugenol on paw withdrawal threshold

In the group receiving the vehicle only, the paw withdrawal threshold values of the ipsilateral limb showed a clear secondary mechanical allodynia throughout the study with mean values ranging between 0.86 ± 0.22 and 5.48 ± 2.91 g (Fig. 2). In the 20 mg/kg eugenol group, secondary mechanical allodynia of the ipsilateral limb was present starting on the second day of treatment (mean = 5.05 ± 3.15 g) and a non-significant decrease in secondary mechanical allodynia was observed throughout the study except for day 28 where a significant difference was observed when compared with the vehicle group ($P < 0.02$). With 40 mg/kg of eugenol dose a significant decrease in secondary mechanical

allodynia was observed during the 1st and 3rd week of treatment when compared to vehicle-treated animals ($P < 0.02$). On day 9, the paw withdrawal threshold decreased dramatically attaining vehicle group value, but by the next testing day it increased significantly reaching a peak at day 16 (mean = 11.87 ± 2.87 g) which was significantly different from the vehicle group ($P < 0.01$). By the 4th week, the paw withdrawal threshold decreased considerably, and so on until the end of the study, with no significant differences observed when compared to the vehicle group.

2.4.4. Modulation of the nervous system by neuropeptide content in the spinal cord

The spinal cord lumbar enlargements were collected for neuropeptide analysis at the end of the study. Substance P and CGRP concentrations of vehicle-treated animals were increased significantly in comparison to normal animals ($P < 0.05$) whereas dynorphin concentration was significantly decreased ($P < 0.05$) (Table 1). With 20 mg/kg eugenol a significant increase of substance P and CGRP was observed when compared to the normal animals together with a significant decrease in dynorphin ($P < 0.05$), mean values being similar to the vehicle-treated animals. With 40 mg/kg eugenol, all peptides concentrations were similar to normal (no insult) animals.

2.4.5. Toxicological assessment

Biochemical and haematological profiles were within reference range and no significant differences were observed between groups. As well, no significant histopathological findings were noted. Half brain analyses revealed eugenol concentrations of 35.0 ± 18.0 ng/g and 59.8 ± 35.2 ng/g for the 20 and 40 mg/kg eugenol-treated groups respectively. These values are within the range previously measured following a single oral administration of 40 mg/kg of eugenol (Lionnet et al., 2010). These results suggest that no drug accumulation occurred in the central nervous system.

2.4.6. Histology

No significant differences in synovial membranes, stroma and structural tissue damage were observed between all osteoarthritic groups. Loss of non-mineralised cartilage was observed with structural erosion surfaces and bone remodelling in the vehicle-treated and the 20 and 40 mg/kg eugenol-treated groups, although more severe in the latter groups ($P < 0.05$). Synoviocyte hyperplasia was less pronounced in the 40 mg/kg treated animals ($P < 0.06$) and light cuboidal synoviocyte hypertrophy in synovial membranes was more pronounced in the 20 mg/kg treated group ($P < 0.02$) with the absence of granular inflammation (data not shown).

2.5. Discussion

The present study evaluated the antinociceptive effects of eugenol in the MIA-injected rat model. Discrepancies between the Catwalk and von Frey results could be associated with differences in spontaneous and evoked pain mechanisms. Eugenol has been reported to be an effective analgesic agent acting on pain-related high voltage calcium and sodium channels (Cho et al., 2008; Lee et al., 2005) and on the TRPV1 receptor (Guenette et al., 2007a). Therefore, we suggest that eugenol's analgesic effects reported in the present study may, in part, be explained by its interaction with the TRPV1 receptor. The latter receptors increase significantly in the spinal neurons of animals with painful osteoarthritis (Fernihough et al., 2005). Moreover, several studies have demonstrated analgesic effects following either single or repeated dosing of TRPV1 antagonists in the MIA model evaluating pain behaviours (Honore et al., 2005; Puttfarcken et al., 2010). However, further work is necessary to clearly identify the specific activity of eugenol on pain-related receptors in this putative model of osteoarthritis.

The present study does not demonstrate any lesional disease modifying effects of eugenol apart from a more severe loss of cartilage observed in the eugenol treated groups.

Other phenolic compounds, such as curcumin and ginger, have recently been reported to have chondroprotective properties (Henrotin et al., 2010; Shen et al., 2003) and eugenol could have had similar effects during the study. However, since joints were collected only at the end of the study, when the degenerative process is well advanced, no conclusions can be drawn at the present time. This finding is important as it suggests that the analgesic effects of eugenol can be attributed to its effect on neuronal mechanisms and not on the joint structures protection. The increase in structural changes could be associated with the animals feeling less pain affecting its mobility and therefore causing more structural damages. Ingestion of eugenol would appear to be relatively safe as no apparent side effects or organ toxicity were observed following daily administration of the high dose for four consecutive weeks.

In order to reduce pain perception while performing daily activities such as walking, human patients with unilateral knee pain tend to minimize weight bearing on the affected limb and consequently have a characteristic limping gait pattern (Kaufman et al., 2001). In the study herein, repetitive daily oral administration of eugenol attenuated the behavioural pain response of the treated animals by diminishing the limping in their gait pattern. However, the hind limb dynamic gait pattern was similar to pre-osteoarthritis induction gait only with the high dose of eugenol during the second and third week of the study. This might be due to different pain mechanisms occurring over time in the MIA model. The MIA model is reported to be biphasic, with an acute inflammatory phase resolving within the first days followed by a degenerative process of the articular structures associated with greater pain characteristics (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997). Eugenol is an anti-inflammatory agent inhibiting cyclooxygenase activity and acting as a competitive inhibitor to prostaglandin synthetase (Dewhirst, 1980) preventing the coupling of arachidonic acid and enzymes of this pathway (Markowitz et al., 1992). These pharmacological properties of eugenol modify the tissue response to a peripheral lesion and minimize the inflammatory response. In a previous study, gait patterns of celecoxib-treated animals were evaluated with the CatWalk and demonstrated a diminished allodynic pain throughout the study but

gait improvement only in the first week following MIA injection (Ferland et al., 2011). Therefore, the reported anti-inflammatory effects of eugenol in the initial inflammatory phase of the model might be responsible for the analgesic effects observed in the first week following the MIA injection. The greatest analgesic effect occurred after three weeks of daily treatment, suggesting a greater effect of eugenol when chronic pain is established. Although the later analgesic effect of eugenol can be explained by its effect on specific receptors, other effects may be related to the degenerative progression in the MIA model. Bone destruction occurs in osteoarthritis and cytokines are mainly responsible for this process. Eugenol blocks the release of bone resorbing mediators such as interleukin-1 β (IL- β) and tumour necrosis factor- α (TNF α) (Lee et al., 2007). Interestingly, trans-resveratrol, a phenolic compound similar to eugenol, showed efficacy in inhibiting the TNF α , IL-1 β and IL-6 production (Marier et al., 2005). At this late stage of the model, the damaged peripheral nerves involving changes in ion channels function bring upfront the potential generation of neuropathic pain. Nerve injury has been reported to be involved in the pain-related behaviour in this rat model (Harvey et Dickenson, 2009; Ivanavicius et al., 2007) and eugenol might play a role in this process since it has an alleviating effect on neuropathic pain (Guenette et al., 2007b).

At the very end of the study, the decrease in secondary mechanical allodynia with eugenol was only demonstrated with the low dose. No differences in the gait parameters were observed between the vehicle and eugenol treated animals, and this for either eugenol doses. This contradiction can be explained in part by the pharmacological properties of eugenol and its site of action. Pharmacological blockade of TRPV1 attenuates the release of substance P (Tang et al., 2008) and the reported preferential action of eugenol in the central nervous system explains the decrease in spinal substance P content (Lionnet et al., 2010). However, since CGRP is co-localised in the same rat knee joint afferent fibres as substance P (Salo et Theriault, 1997), a decrease in CGRP might be a consequence of a diminished activity of these cells. It is plausible that the repeated administration of low dose eugenol shows some efficacy only at the end of the study due to an accumulated effect on the

receptors, which would suggest that receptors could be saturated with the high dose treatment. With the high eugenol dose, substance P and CGRP spinal cord concentrations were decreased but the animals were clearly allodynic. The increased dynorphin concentrations observed between the high dose and the vehicle-treated group might be a consequence of the diminution of the pronociceptive message modulated by small peptidergic afferent fibres, suggesting a pronociceptive role in the modulation of pain in the MIA model. Several studies have demonstrated a pronociceptive function of dynorphin in the spinal cord associated with actions on NMDA (Tan-No et al., 2005) and bradykinin (Lai et al., 2006) receptors inducing calcium influx in sensory neurons. Therefore, the upregulation of dynorphin may counteract the ability of eugenol at reducing calcium influx (Lee et al., 2005). High dose eugenol could also affect other neurotransmitters and receptors involved in nociceptive transduction that may maintain the chronic state of osteoarthritis-related pain. Our results suggest that proper eugenol dose and administration regimen has yet to be determined to maximize efficacy in order to minimize central sensitization of osteoarthritis.

The overall lack of efficacy of eugenol treatment on gait parameters during the last week of the study may be due in part to the MIA-injected concentration. At 3 mg/kg, the joint structural damages are severe and coupled with a great degree of sensitization of the afferent nerve fibres (Schuelert et McDougall, 2009). The highly significant increase in joint afferent firing rate may be too elevated, and the associated pain response too great for the proposed treatment in our study. Since the direct relationship between MIA-injected dose and nociceptive response has been reported, it would be interesting to evaluate the efficacy of eugenol in osteoarthritis-related pain with a lower dose of MIA.

Conversely, spinal cord peptide results measured at the end of the experiment revealed an ongoing positive effect of eugenol treatment since a decrease of both substance P and CGRP spinal cord concentrations was observed but only for the high dose-treated rats. This contradiction with secondary mechanical allodynia results again suggests that eugenol does decrease some pronociceptive peptides but that other mechanisms play a role

in central sensitization. Since peptides were analysed only at the end of the study, the information is available for only one time point. Further work looking at a greater number of peptides, including substance P, CGRP and dynorphin, and the modulation of eugenol on peptides concentrations throughout the progressive degenerative process following MIA injection is necessary before we can fully comprehend our results.

2.5.1. Conclusions

In summary, these results support the hypothesis that an oral administration of eugenol may produce antinociceptive effects in the MIA-induced rat model when the lesions are moderately severe. Altogether, the present findings coupled with the lack of evidence of any ill effects of repetitive treatment of eugenol suggest a therapeutic potential for simple vanilloids that could be useful for the development of new therapeutic strategies to alleviate osteoarthritis-related pain. Further work is needed to establish the proper dose regimen in relation to the severity and the progression of osteoarthritis.

2.6. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Sheila Laverty for the help in reviewing the manuscript, Dr Christiane Girard for the histological analysis and Marie-Thérèse Parent for the preparation of the images. Catherine E. Ferland is a recipient of a scholarship from the Canadian Arthritis Network and The Arthritis Society (CAN/TAS).

2.7. References

- Ahmed, M., Bjurholm, A., Schultzberg, M., Theodorsson, E., Kreicbergs, A., 1995. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum.* 38, 699-709.
- 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, 940-950.
- Bove, S.E., Calcaterra, S.L., Brooker, R.M., Huber, C.M., Guzman, R.E., Juneau, P.L., Schrier, D.J., 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 Cartilage* 11, 821-830.
- Cho, J.S., Kim, T.H., Lim, J.M., Song, J.H., 2008. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1243, 53-62.
- Combe, R., Bramwell, S., Field, M.J., 2004. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci. Lett.* 370, 236-240.
- Deumens, R., Jaken, R.J., Marcus, M.A., Joosten, E.A., 2007. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J. Neurosci. Methods* 164, 120-130.
- Dewhirst, F.E., 1980. Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins* 20, 209-222.
- Dieppe, P.A., Lohmander, L.S., 2005. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365, 965-973.

- Ferland, C.E., Lavery, S., Beaudry, F., Vachon, P., 2011. Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 603-610.
- Fernihough, J., Gentry, C., Bevan, S., Winter, J., 2005. Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci. Lett.* 388, 75-80.
- Fernihough, J., Gentry, C., Malcangio, M., Fox, A., Rediske, J., Pellas, T., Kidd, B., Bevan, S., Winter, J., 2004. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112, 83-93.
- Gardell, L.R., Wang, R., Burgess, S.E., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Jr., Lai, J., Porreca, F., 2002. Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. *J. Neurosci.* 22, 6747-6755.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 6666-6670.
- Guenette, S.A., Helie, P., Beaudry, F., Vachon, P., 2007a. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg* 34, 164-170.
- Guenette, S.A., Ross, A., Marier, J.F., Beaudry, F., Vachon, P., 2007b. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 562, 60-67.
- Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P., Gillet, P., 1997. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* 40, 1670-1679.
- 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.

Hellio Le Graverand-Gastineau, M.P., 2009. OA clinical trials: current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1393-1401.

Henrotin, Y., Clutterbuck, A.L., Allaway, D., Lodwig, E.M., Harris, P., Mathy-Hartert, M., Shakibaei, M., Mobasheri, A., 2010. Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 141-149.

Honore, P., Wismer, C.T., Mikusa, J., Zhu, C.Z., Zhong, C., Gauvin, D.M., Gomtsyan, A., El Kouhen, R., Lee, C.H., Marsh, K., Sullivan, J.P., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F., 2005. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 410-421.

Ivanavicius, S.P., Ball, A.D., Heapy, C.G., Westwood, F.R., Murray, F., Read, S.J., 2007. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128, 272-282.

Kalbhenn, D.A., 1987. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J. Rheumatol.* 14 Spec No, 130-131.

Kaufman, K.R., Hughes, C., Morrey, B.F., Morrey, M., An, K.N., 2001. Gait characteristics of patients with knee osteoarthritis. *J. Biomech.* 34, 907-915.

Lai, J., Luo, M.C., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Porreca, F., 2006. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 9, 1534-1540.

Lai, J., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Jr., Porreca, F., 2001. Neuropathic pain: the paradox of dynorphin. *Molecular Interventions* 1, 160-167.

Lavery, S., Girard, C.A., Williams, J.M., Hunziker, E.B., Pritzker, K.P., 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S53-65.

Lee, M.H., Yeon, K.Y., Park, C.K., Li, H.Y., Fang, Z., Kim, M.S., Choi, S.Y., Lee, S.J., Lee, S., Park, K., Lee, J.H., Kim, J.S., Oh, S.B., 2005. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *J. Dent. Res.* 84, 848-851.

Lee, Y.Y., Hung, S.L., Pai, S.F., Lee, Y.H., Yang, S.F., 2007. Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators in human macrophages. *J. Endod.* 33, 698-702.

Lionnet, L., Beaudry, F., Vachon, P., 2010. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytother. Res.* 24, 1645-1653.

Marier, J.F., Chen, K., Prince, P., Scott, G., del Castillo, J.R., Vachon, P., 2005. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can. J. Vet. Res.* 69, 151-154.

Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M., Kim, S., 1992. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 73, 729-737.

Ohkubo, T., Shibata, M., 1997. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J. Dent. Res.* 76, 848-851.

Puttfarcken, P.S., Han, P., Joshi, S.K., Neelands, T.R., Gauvin, D.M., Baker, S.J., Lewis, L.G., Bianchi, B.R., Mikusa, J.P., Koenig, J.R., Perner, R.J., Kort, M.E., Honore, P., Faltynek, C.R., Kym, P.R., Reilly, R.M., 2010. A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ol], a novel,

selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain* 150, 319-326.

Salo, P.T., Theriault, E., 1997. Number, distribution and neuropeptide content of rat knee joint afferents. *J. Anat.* 190 (Pt 4), 515-522.

Schuelert, N., McDougall, J.J., 2009. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci. Lett.* 465, 184-188.

Shen, C.L., Hong, K.J., Kim, S.W., 2003. Effects of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on decreasing the production of inflammatory mediators in sow osteoarthrotic cartilage explants. *J Med Food* 6, 323-328.

Tan-No, K., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Nijima, F., Sato, T., Satoh, S., Sakurada, S., Marinova, Z., Yakovleva, T., Bakalkin, G., Terenius, L., Tadano, T., 2005. Pronociceptive role of dynorphins in uninjured animals: N-ethylmaleimide-induced nociceptive behavior mediated through inhibition of dynorphin degradation. *Pain* 113, 301-309.

Tang, H.B., Li, Y.S., Miyano, K., Nakata, Y., 2008. Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 55, 1405-1411.

Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.B., Lee, C.H., Lee, J.K., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B., 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J. Dent. Res.* 82, 781-785.

2.8. Legend to figures

Figure 1. Gait parameters evaluated with the CatWalk analysis in male Sprague-Dawley rats. Mean (\pm SEM) in the ipsilateral (intra-articular monoiodoacetate 3 mg/30 μ l in the knee joint) and contralateral (control) hind limbs of the swing speed, swing phase duration and duty cycle (bottom) for the vehicle-treated, 20 or 40 mg/kg eugenol groups ($n = 6$ /group). All parameters are expressed as a % of the baseline values. With high dose eugenol treatment, significant differences are present for all three gait parameters when compared with the vehicle-treated animals ($P < 0.05$). Baseline (100 %) is represented by the dotted line. Statistics used are mixed linear model ANOVA.

Figure 2. Mean (\pm SEM) paw withdrawal threshold (g) evaluated with the von Frey filaments of the ipsilateral hind limbs prior to and following intra-articular monoiodoacetate (3 mg/30 μ l) in male Sprague-Dawley rats. Daily treatments for 4 consecutive weeks of the vehicle, 20 or 40 mg/kg eugenol were administered orally to each group ($n = 6$ /group) respectively. Statistics used are Friedman ANOVA and post hoc paired independent t -tests. * = $P < 0.01$, ** = $P < 0.02$

Table I

Mean (\pm SD) neuropeptide concentrations (pmol/g) in lumbar spinal cord enlargements in normal (no insult), vehicle-treated and eugenol-treated (intra-articular monoiodoacetate injected in the knee) animals (20 and 40 mg/kg eugenol, p.o.) 31 days post osteoarthritis induction. ^a = Significantly different in comparison to the normal animals ($P < 0.05$).

	Normal	Vehicle	Eugenol 20mg/kg	Eugenol 40 mg/kg
Sub P	67.6 (57.3)	184.7 (42.73) ^a	189.3 (23.47) ^a	103.3 (10.6)
CGRP	2541.2 (293.32)	4971.8 (752.78) ^a	4421.0 (738.94) ^a	2995.7 (398.75)
Dynorphin	779.4 (111.44)	401.3 (58.0) ^a	528.1 (64.4) ^a	606.7 (68.8)

Figure 1

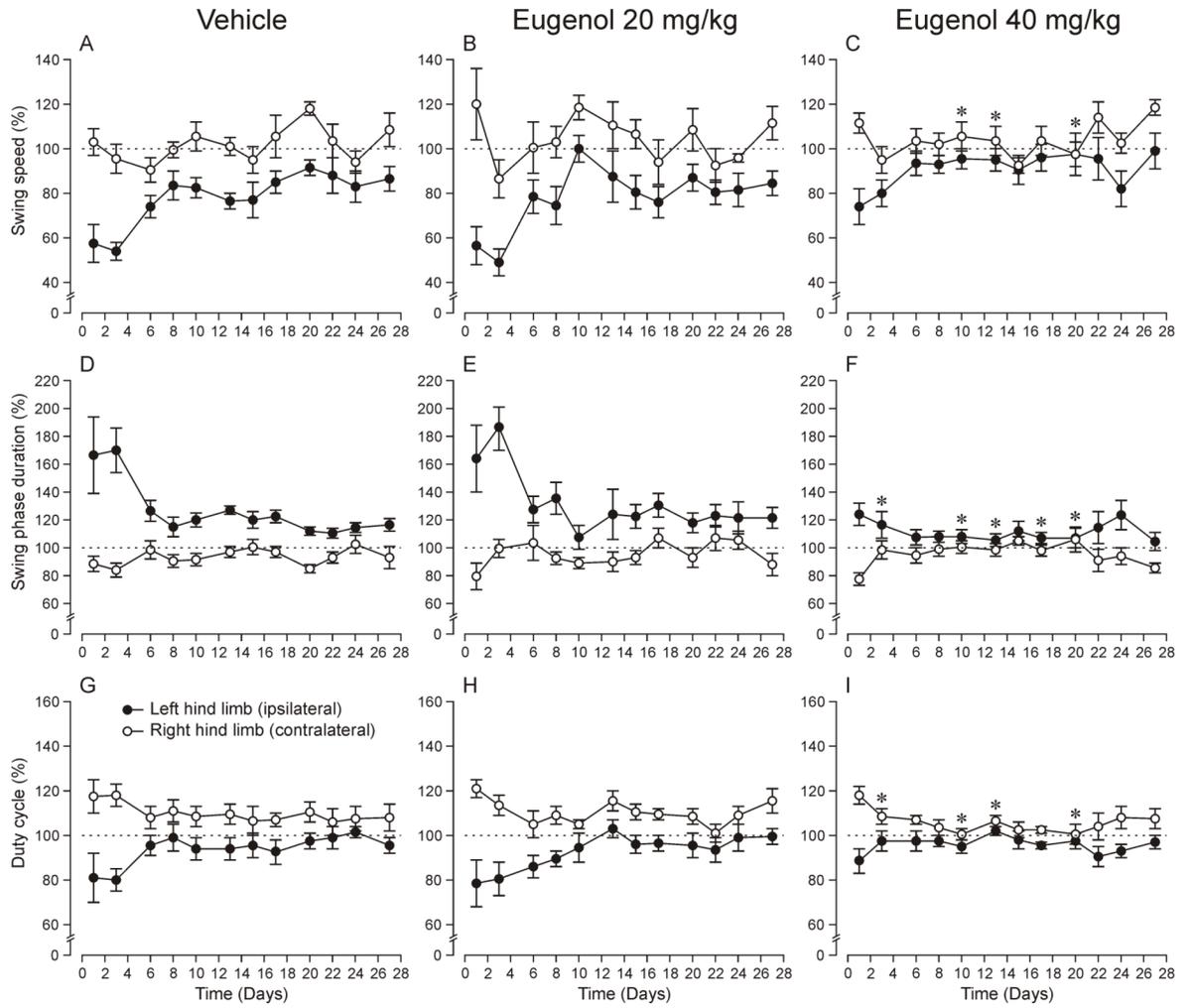
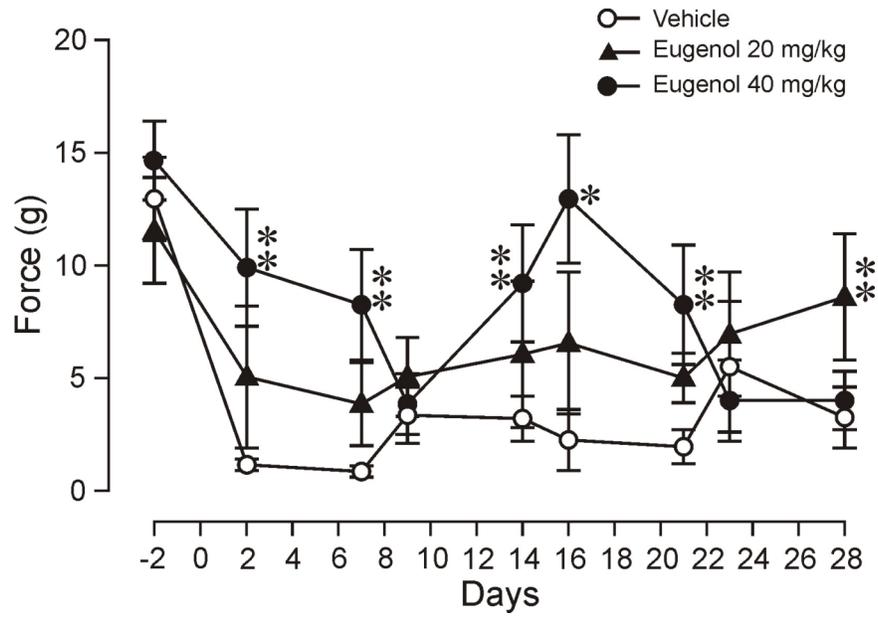


Figure 2



Article 3 :

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2011), with permission from Elsevier. License number : 2740811283911.

Catherine E. Ferland¹, Floriane Pailleux^{1,2}, Pascal Vachon¹ and Francis Beaudry³ (2011).

Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry

Neuropeptides (In Press).

¹ Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada.

² UMR 5180 Sciences Analytiques, Université de Lyon 1, Villeurbanne, France

³ Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

3.1. Abstract

Animal models are useful to evaluate pharmacological therapies to alleviate joint pain. The present study characterized central neuropeptides modulation in the monoiodoacetate (MIA) rat model. Animals receiving a single 3 mg MIA injection were euthanized at 3, 7, 14, 21 and 28 days post injection. Spinal cords were analyzed by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. Up-regulations of the calcitonin gene-related peptide and substance P were observed starting on days 7 and 28 respectively, whereas big dynorphin₍₁₋₃₂₎ content decreased significantly on day 14 in comparison to control animals ($P < 0.05$). Preclinical drug evaluations using this model should be conducted between 7 and 21 days post injection when the lesions resemble most to human osteoarthritis.

Keywords: Pain, Osteoarthritis, Substance P, CGRP, Big Dynorphin, Dynorphin A, Mass Spectrometry, Bioanalysis, Biomarkers, Rat

3.2. Introduction

Pain is one of the primary clinical symptoms associated with osteoarthritis (OA) leading to the partial loss of joint function (Dieppe et Lohmander, 2005). Still, pain relief remains only partial and not fully understood. Consequently, peripheral and central pain mechanisms may depend on the progression of the pathology. Thus, it is essential to further investigate the mechanisms responsible for the initiation and maintenance of pain in order to develop better effective treatment therapies to alleviate pain related to OA.

Following peripheral tissue injury, pronociceptive mediators sensitize sensory fibers axons located throughout the knee joint leading to central neurogenic changes in the dorsal horn of the spinal cord and affecting the transmission and modulation of the afferent signal (Salo et Theriault, 1997). Upon Ca^{2+} influx in the presynaptic terminals of the sensory fibers, neuropeptides are released in the intersynaptic space and are found to either activate neurons of the dorsal horn consequently enhancing the nociceptive input or regulate the descending output of the postsynaptic neurons (Kow et Pfaff, 1988). The central involvement of co-localized neuropeptides substance P (SP) and the calcitonin gene-related peptide (CGRP) have been largely reported in the OA pain-related process (Keeble et Brain, 2004; Schaible et al., 2005; Zhang et al., 2001). Although with some controversy reported, their expression in the rat spinal cord is reported to be up-regulated in chronic models of inflammatory joint pain (Sharif Naeini et al., 2005; Staton et al., 2007) and neuropathic pain (Kanai et al., 2005; Ma et Quirion, 2006; Vachon et al., 2004). The up-regulation of both neuropeptides increases excitatory amino acids effects, sensitizes the dorsal horn neurons and enhances the transmission of the nociceptive input (Ebersberger et al., 1999; Ferreira-Gomes et al., 2010; Neugebauer et al., 1996).

Furthermore, it has been reported that SP might interact with the opioid endogenous system (Zubrzycka et Janecka, 2000). In consequence to the peripheral lesion, descending output causes spinal endogenous opioid peptide release (Lai et al., 2001). Specific proteolytic fragments of prodynorphin, namely big dynorphin₍₁₋₃₂₎ (Big Dyn) and

dynorphin A (DynA) are co-localized with SP and CGRP in peptidergic C-fibers in the spinal cord (Marvizon et al., 2009) and are principally acting on the NMDA and κ -opioid receptors respectively (Ko et al., 2000; Tan-No et al., 2002). Spinal concentration of DynA was reported to increase in pathological states (Malan et al., 2000; Parra et al., 2002) and theoretically, should inhibit the pain transmission as DynA can inhibit SP release in the rat spinal cord (Zachariou et Goldstein, 1997) and the nociceptive synaptic transmission by blocking the calcium channels (Werz et Macdonald, 1985). Several lines of evidence have indicated that dynorphins act as pronociceptive peptides by activating non-opioid receptors (Lai et al., 2006; Tang et al., 2000) and participate in the generation of chronic pain (Wang et al., 2001).

One of the most currently employed model for OA pain studies with the objective of evaluating the efficacy of analgesic drugs is the MIA injection in the rat knee joint (Bove et al., 2009). MIA acts on the structural integrity of the cartilage by disrupting the chondrocytes glycolysis (Kalbhen, 1987), generating structural changes similar to the human pathology (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997). Previous behavioral studies have confirmed an initial transient pain response associated with early inflammatory mechanisms caused by structural changes, followed by a second greater pain response resulting from the articular degenerative process (Bove et al., 2003; Ivanavicius et al., 2007). Following the MIA injection, alterations in hind limb weight bearing are observed (Pomonis et al., 2005) and the presence of profound secondary mechanical allodynia in the injected limb reveals the occurrence of central pain mechanisms (Fernihough et al., 2004; Im et al., 2010). However, the central molecular mechanisms of pain transmission and maintenance are not fully understood.

In a previous study, we have demonstrated the modulation of pain in the MIA rat model with the assessment of behavioral spontaneous and evoked pain responses over a one-month period following the injection (Ferland et al., 2011). These assessments revealed a great evidence of pain-related behavior in the MIA-induced model with gait disturbances and marked secondary mechanical allodynia, accompanied with an up-regulation of SP and

CGRP in comparison to naïve animals observed on the last day of assessment. These latter molecular indices were thought to be of great interest in the understanding of the central pain mechanisms occurring in this model and were further investigated. Therefore, the aim of the present study was to characterize over a one-month period the modulation of specific pain-related neuropeptides in association with the degeneration of the articular structures and to determine their potential used as biomarkers. Neuropeptides concentrations were measured in the lumbar enlargement of the rat spinal cords at various time points and compared with the histopathological changes observed in the articulation and the previous reported behavioral characterization of the MIA model.

3.3. Experimental procedures

3.3.1. Chemicals and Reagents

The chemicals sodium monoiodoacetate (MIA) (SigmaUltra, 19148-5G), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), acetic anhydride 99.5% (Ac₂O) and ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) were obtained from Sigma Aldrich, Inc (Saint-Louis, MO, USA). Substance P, CGRP, DynA and Big Dyn were purchased from Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA, USA). Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific (NJ, USA) and trifluoroacetic acid (TFA), formic acid (FA) and ammonium hydroxide (NH₄OH) 28.0-30.0% were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Standard solutions were prepared as previously performed (Beaudry et al., 2009).

3.3.2. *In Vivo* experiments

The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. On day 0, male Sprague-Dawley rats weighing 200-225g were anaesthetized with

isoflurane 2%. Forty animals received a single intra-articular injection through the patellar ligament of 30 μ l of a 0.1 mg/ μ l MIA saline solution using of a 0.1 cc syringe with a 25G needle and were sacrificed at various time points (days 3, 7, 14, 21 and 28, n =8/ time point). Sixteen control animals received a single 30 μ l saline intra-articular injection and were sacrificed on days 3 and 28 (n = 8/ time point). Rats were euthanized with an overdose of isoflurane followed by a transection of the cervical spine. A flush of saline was performed within the spinal canal to collect the spinal cord lumbar enlargement. Samples were snapfrozen in cold hexane and stored at -80°C pending analysis. Knee joints were dissected free of muscle, collected and fixed in a 10% formaldehyde solution (Fisher Scientific, NJ).

3.3.3. Histological procedures

Knee joints remained in formaldehyde solution for 48 h and were transferred into a decalcification buffer, pH 7.3, containing 20% EDTA for 14 days and placed for 48 h in 10% formaldehyde solution for paraffin embedding. Coronal sectioning was performed and 4 μ m sections were collected and stained with Safranin O-fast green (SOFG) to clearly mark proteoglycans of the extracellular matrix. Sections were mounted, analyzed with the use of a Leica microscope and scored according to modified OARSI histopathology initiative published scales (Lavery et al., 2010).

3.3.4. Synthesis of the internal standards

Acetylated neuropeptides were used as internal standards. Ac₂O reacts principally with the N-terminal primary amine but also with the lysine primary amine. The reaction was performed as previously described (Che et Fricker, 2002). Briefly, the targeted peptides were diluted in a 0.2 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.5). Two hundred μ l of standard peptides solution were mixed with 10 μ l of Ac₂O (\approx 10 000 molar excess) in a microcentrifuge vial. Ten μ l of NH₄OH were added and the reaction was stopped after 30 min by further diluting the peptides with a 0.25% TFA solution to obtain a final

concentration of 500 pg/ μ l. The internal standard mixture was tested by HPLC-MS/MS and less than 1% of the original peptides was observed. Due to a varied distribution of derivative products for Big Dyn, acetylated DynA was used as an internal standard for both Big Dyn and DynA quantifications.

3.3.5. Spinal cord sample preparation

Following the collection, the tissues were weighed frozen and homogenized. Rat spinal cords were weighed accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of 0.25% TFA solution at a ratio of 1:5 (w/v) (Beaudry, 2010). The samples were sonicated for 20 min and 150 μ l of the homogenate was mixed with 150 μ l of acetonitrile to remove larger proteins. The samples were vortexed and centrifuged at 12,000g for 10 min and 150 μ l of the supernatant were transferred into an injection vial and 150 μ l of the internal standard solution were added. Vials were capped and vigorously vortexed prior analysis.

3.3.6. Instrumentation

The HPLC-MS/MS system is comprised of a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo LCQ Advantage Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA), and regression analysis were performed with PRISM (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the peak-area ratios of the neuropeptides and the acetylated neuropeptides analogue internal standards.

3.3.7. Bioanalytical methods

The analytical method used was based on a previously published method (Beaudry et al., 2009). The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100 \times 1 mm with a particle size of 5 μ m. The

initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.4% of formic acid) at a ratio of 5:95, respectively. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 min a linear gradient was applied up to a ratio of 60:40 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted during the initial condition and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min for a total run time of 30 min. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{l}/\text{min}$. All targeted neuropeptides and acetylated neuropeptides eluted between 8.2 to 10.7 min. Two μl of sample were injected using full loop mode. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source (ESI). The sheath gas was set to 5 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300°C and the capillary voltage to 34 V. The mass spectrometer operated for quantitative analysis in multiple reaction monitoring (MRM) mode and the mass transitions and collision energies are presented in Table 1.

3.3.8. Statistical analysis

All data were analyzed using an unpaired Student's t-Test to compare values of each time point with the control values. Significance was set *a priori* to $P < 0.05$. The analyses were performed with PRISM (version 5.0d).

3.4. Results

3.4.1. Histopathological changes

The saline-injected animals sacrificed at days 3 and 28 had a normal articular surface and underlying subchondral bone with a homogenous staining of the cartilage matrix (Fig. 1A and 1G). The MIA model resulted in a time-dependent increase of structural damages where on days 3, 7 and 14 it revealed a loss of cartilage proteoglycans and chondrocytes on both the femoral and tibial structures (Fig. 1B, C and D). The greatest

structural changes were observed on day 21 where severe disease features occurred (Fig. 1E). Complete erosions of the hyaline cartilage on both the femoral and tibial surfaces were observed accompanied with a deformation of the articular surface in all the injected joints. The knee joints of animals sacrificed on day 28 were similar to the ones of day 21 (Fig. 1F).

3.4.2. Analytical performance

The response linearity base on the measured ratio of the peptides and corresponding acetylated derivative was tested at 5 distinct concentrations in 6 replicates. As illustrated in Fig. 2, the results showed that measured concentration correlates ($R^2 \geq 0.9946$) very well with the nominal concentration of targeted peptides. In addition, precision and accuracy of the analytical assay was assessed similarly to previous published method (Beaudry et al., 2009). The accuracy (%NOM) observed was ranging from 93.0-104.5%, 90.0-107.1%, 88.4-107.4% and 92.8-107.4% for SP, CGRP, DynA and Big Dyn respectively. The precision (%CV) observed was ranging from 4.1–16.2%, 1.6–16.1%, 2.6–12.1% and 4.9–13.9% for SP, CGRP, DynA and Big Dyn respectively. The results obtained suggest that the method provides adequate figures of merits for targeted peptide analysis performed during this study.

3.4.3. Spinal peptide regulation

Targeted neuropeptide analysis of control groups (i.e. days 3 and 28) revealed no significant differences. However, variations in the modulation of specific neuropeptide concentrations were observed over time with the evolution of the knee pathology. At seven days post MIA injection, the spinal CGRP concentrations were significantly up-regulated in comparison with the control groups ($P < 0.0005$) (Fig. 3B). The increase of CGRP was significantly up-regulated in comparison to both control groups (i.e. days 3 and 28) for the next collection days and until the end of the experiment at day 28 ($P < 0.001$). The SP concentrations of the injured animals were not significantly up-regulated over time but data

still suggest that the concentrations are increasing (Fig. 3A). However at day 28, a significant up-regulation of its spinal content was observed when compared to the control groups ($P < 0.02$ with day 28 and $P = 0.053$ with day 3 controls). A down-regulation of spinal DynA was observed over time as the structural damages progressed, although no statistically significant differences were observed in comparison with control groups ($P > 0.05$), and returned near normal concentrations by day 28 (Fig. 3C). The modulation of Big Dyn also demonstrated a down-regulation over time including a significant difference with controls on day 14 ($P < 0.05$ with day 3 and $P < 0.0007$ with day 28 controls) followed by a return to normal values by day 28 (Fig. 3D).

3.5. Discussion

Although structural changes were apparent starting on day 3 post injection (Fig. 1B), significant pronociceptive neuropeptides up-regulation started 7 days post injection. These results corroborate with the reported second transient behavioral pain response initiated 7 days post injection in this model (Bove et al., 2003; Combe et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007). The greatest structural changes were observed on day 21 and maintained relatively stable through day 28 where severe cartilage loss and bone modifications occurred (Fig. 1E and F). A neuropathic pain component has been associated with the MIA-induced pain response observed at late time points (Harvey et Dickenson, 2009; Ivanavicius et al., 2007). Nerve injury occurring during the pathological course might be responsible for the spinal changes rather than the damages to the joint structures themselves. The neuropeptides up-regulation observed at these late time points suggest that a long-lasting drive activates the peptidergic primary afferent C-fibers, resulting in central sensitization. The increase of concentrations observed for specific pronociceptive neuropeptides in the spinal cord during this study is in line with our previous study reporting up-regulations of SP and CGRP, relative to naïve animals, 28 days post MIA injection accompanied with clear behavioral pain responses (Ferland et al., 2011), and other

studies are reporting similar findings in the 3 mg MIA-induced OA pain model (Ferreira-Gomes et al., 2008; Puttfarcken et al., 2010; Schuelert et McDougall, 2009). However, recently, down-regulations of CGRP and SP gene expression in the sensory neurons 5 weeks post MIA injection were reported (Im et al., 2010). Most neuropeptides are the results of posttranslational modifications of precursor proteins involving proteolytic processing enzymes (Hook et al., 2008). Consequently, the measure of CGRP and SP gene expression by real-time PCR cannot be used as a reliable measure of neuropeptides modulation. A direct measurement of neuropeptides by mass spectrometry is more adequate to assess neuropeptides modulation time course.

In the central nervous system, CGRP release enhances excitatory glutamate effects causing an increase of neurons excitability by mechanisms involving increased intracellular levels of calcium and activation of protein kinases second messenger pathways (Ebersberger et al., 2000; Sun et al., 2004). Consequently, the up-regulation of CGRP is coherent with a prolonged behavioral pain response reported for this putative OA rat model. Furthermore, CGRP release is known to enhance central SP release from primary afferent fibers (Oku et al., 1987). Results of the present study demonstrated the marked role of CGRP in the development of the spinal nociceptive process accompanied with a later action of SP in the maintenance of OA-related pain.

The inhibition of SP release from primary afferent fibers observed until day 28 was hypothesized to be the consequence of the action of endogenous opioid peptides. Spinal opioid peptide DynA contained in interneurons and projection neurons has been reported to play a role in the inhibition of pain transmission by its high affinity with the κ -opioid receptor (Dubner et Ruda, 1992). Since Big Dyn contains the sequence of DynA, a down-regulation of Big Dyn could be linked to posttranslational modifications of precursor protein prodynorphin and consequently may reduce the concentration of DynA. Opioid peptides are produced by endoproteolytic processing involving proprotein convertase 1 and 2 (PC1/PC2) and down-regulation of Big Dyn and DynA may suggest that posttranslational processing of proopiomelanocortin and proenkephalin might also be hindered.

Consequently, the results obtained suggest that the central inhibitory opioid system seem to be inefficient. As previously acknowledged, the main biological action of DynA is via the κ -opioid receptor (Ko et al., 2000). When binding occurs between the κ -opioid receptor and an agonist, the release of SP and CGRP from sensory fibers is consequently decreased (Fichna et al., 2007; Zachariou et Goldstein, 1997). In the study herein, DynA concentrations were decreased until day 21, suggesting that the endogenous opioid system may have been ineffective in the early stage and consequently DynA could not contribute to the maintenance or decrease of SP and CGRP concentrations. Conversely, spinal Big Dyn regulation appears to be linked to the tachykinin system, as the upstream regulatory increase starting on day 14 tends to follow the increase of SP. The binding of Big Dyn to the NMDA receptor enhances the glutamatergic transmission and by the co-localization of vesicular glutamate, SP and CGRP, their release becomes consequently increased (Marvizon et al., 2009). Therefore, the significant increase of SP by day 28 appears to be related to the observed return to normal values of both dynorphins on the same day. Therefore, the involvement of the NMDA receptor in the synaptic plasticity is suggested to be responsible for the long-term pain response observed in this putative model of OA-related pain. The activation of NMDA receptors contributes to the maintenance of the musculoskeletal pain state (Hewitt, 2000; Salter, 2005) and binding with these receptors may be modulated by opioids (Mao, 1999). NMDA-receptor activation does not only increases response to pain stimuli, it also decreases neuronal sensitivity to opioid receptor agonists (Bennett, 2000). Although DynA has been shown to produce naloxone-reversible inhibition of NMDA receptor (Caudle et al., 1994), DynA is involved in the nociceptive transmission facilitator mechanism. The spinal pronociceptive contribution of DynA and Big Dyn via the NMDA receptor-ion channel complex reported previously (Tan-No et al., 2005) appears to corroborate with the results of this study.

3.6. Concluding remarks

The findings on spinal mechanisms along with the histopathological evaluation suggest that preclinical drug evaluations using the MIA model should be conducted between 7 and 21 days post injection. Thus, the evaluation of analgesic drug candidates must consider the pathological state to properly evaluate efficiency.

3.7. Acknowledgements

The authors would like to thank H el ene Richard for technical assistance in the histology figures. Catherine E Ferland is a recipient of a Canadian Arthritis Network/ The Arthritis Society trainee scholarship. Francis Beaudry is funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; Grant No. 386637).

3.8. References

- Beaudry, F., 2010. Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry-based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Anal. Biochem.* 407, 290-292.
- 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, 940-950.
- Bennett, G.J., 2000. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J. Pain Symptom Manage.* 19, S2-6.

- Bove, S.E., Calcaterra, S.L., Brooker, R.M., Huber, C.M., Guzman, R.E., Juneau, P.L., Schrier, D.J., 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 Cartilage* 11, 821-830.
- Bove, S.E., Flatters, S.J., Inglis, J.J., Mantyh, P.W., 2009. New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev* 60, 187-201.
- Caudle, R.M., Chavkin, C., Dubner, R., 1994. Kappa 2 opioid receptors inhibit NMDA receptor-mediated synaptic currents in guinea pig CA3 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 14, 5580-5589.
- Che, F.Y., Fricker, L.D., 2002. Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 3190-3198.
- Combe, R., Bramwell, S., Field, M.J., 2004. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci. Lett.* 370, 236-240.
- Dieppe, P.A., Lohmander, L.S., 2005. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365, 965-973.
- Dubner, R., Ruda, M.A., 1992. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 15, 96-103.
- Ebersberger, A., Charbel Issa, P., Vanegas, H., Schaible, H.G., 2000. Differential effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide 8-37 upon responses to N-methyl-D-aspartate or (R, S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-

methylisoxazole-4-propionate in spinal nociceptive neurons with knee joint input in the rat. *Neuroscience* 99, 171-178.

Ebersberger, A., Grubb, B.D., Willingale, H.L., Gardiner, N.J., Nebe, J., Schaible, H.G., 1999. The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience* 93, 775-781.

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, 603-610.

Fernihough, J., Gentry, C., Malcangio, M., Fox, A., Rediske, J., Pellas, T., Kidd, B., Bevan, S., Winter, J., 2004. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112, 83-93.

Ferreira-Gomes, J., Aadaes, S., Castro-Lopes, J.M., 2008. Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *J Pain* 9, 945-954.

Ferreira-Gomes, J., Aadaes, S., Sarkander, J., Castro-Lopes, J.M., 2010. Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis Rheum.* 62, 3677-3685.

Fichna, J., Janecka, A., Costentin, J., Do Rego, J.C., 2007. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol. Rev.* 59, 88-123.

Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P., Gillet, P., 1997. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* 40, 1670-1679.

- 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.
- Hewitt, D.J., 2000. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. *Clin. J. Pain* 16, S73-79.
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., Hwang, S.R., 2008. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 393-423.
- Im, H.J., Kim, J.S., Li, X., Kotwal, N., Sumner, D.R., van Wijnen, A.J., Davis, F.J., Yan, D., Levine, B., Henry, J.L., Desevre, J., Kroin, J.S., 2010. Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum.* 62, 2995-3005.
- Ivanavicius, S.P., Ball, A.D., Heapy, C.G., Westwood, F.R., Murray, F., Read, S.J., 2007. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128, 272-282.
- Kalbhen, D.A., 1987. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J. Rheumatol.* 14 Spec No, 130-131.
- Kanai, Y., Nakazato, E., Fujiuchi, A., Hara, T., Imai, A., 2005. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology* 49, 977-984.

- Keeble, J.E., Brain, S.D., 2004. A role for substance P in arthritis? *Neurosci. Lett.* 361, 176-179.
- Ko, M.C.H., Willmont, K.J., Burritt, A., Hruby, V.J., Woods, J.H., 2000. Local inhibitory effects of dynorphin A-(1-17) on capsaicin-induced thermal allodynia in rhesus monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* 402, 69-76.
- Kow, L.M., Pfaff, D.W., 1988. Neuromodulatory actions of peptides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28, 163-188.
- Lai, J., Luo, M.C., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Porreca, F., 2006. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 9, 1534-1540.
- Lai, J., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Jr., Porreca, F., 2001. Neuropathic pain: the paradox of dynorphin. *Molecular Interventions* 1, 160-167.
- Lavery, S., Girard, C.A., Williams, J.M., Hunziker, E.B., Pritzker, K.P., 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S53-65.
- Ma, W., Quirion, R., 2006. Increased calcitonin gene-related peptide in neuroma and invading macrophages is involved in the up-regulation of interleukin-6 and thermal hyperalgesia in a rat model of mononeuropathy. *J. Neurochem.* 98, 180-192.
- Malan, T.P., Ossipov, M.H., Gardell, L.R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai, J., Porreca, F., 2000. Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain* 86, 185-194.

- Mao, J., 1999. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 289-304.
- Marvizon, J.C., Chen, W., Murphy, N., 2009. Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J. Comp. Neurol.* 517, 51-68.
- Neugebauer, V., Rumenapp, P., Schaible, H.G., 1996. Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation. *Neuroscience* 71, 1095-1109.
- 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.
- Parra, M.C., Nguyen, T.N., Hurley, R.W., Hammond, D.L., 2002. Persistent inflammatory nociception increases levels of dynorphin 1-17 in the spinal cord, but not in supraspinal nuclei involved in pain modulation. *J Pain* 3, 330-336.
- Pomonis, J.D., Boulet, J.M., Gottshall, S.L., Phillips, S., Sellers, R., Bunton, T., Walker, K., 2005. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114, 339-346.
- Puttfarcken, P.S., Han, P., Joshi, S.K., Neelands, T.R., Gauvin, D.M., Baker, S.J., Lewis, L.G., Bianchi, B.R., Mikusa, J.P., Koenig, J.R., Perner, R.J., Kort, M.E., Honore, P., Faltynek, C.R., Kym, P.R., Reilly, R.M., 2010. A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ol], a

novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain* 150, 319-326.

Salo, P.T., Theriault, E., 1997. Number, distribution and neuropeptide content of rat knee joint afferents. *J. Anat.* 190 (Pt 4), 515-522.

Salter, M.W., 2005. Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. *Curr Top Med Chem* 5, 557-567.

Schaible, H.G., Del Rosso, A., Matucci-Cerinic, M., 2005. Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 31, 77-101, ix.

Schuelert, N., McDougall, J.J., 2009. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci. Lett.* 465, 184-188.

Sharif Naeni, R., Cahill, C.M., Ribeiro-da-Silva, A., Menard, H.A., Henry, J.L., 2005. Remodelling of spinal nociceptive mechanisms in an animal model of monoarthritis. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2005-2015.

Staton, P.C., Wilson, A.W., Bountra, C., Chessell, I.P., Day, N.C., 2007. Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *European Journal of Pain* 11, 283-289.

Sun, R.Q., Tu, Y.J., Lawand, N.B., Yan, J.Y., Lin, Q., Willis, W.D., 2004. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J. Neurophysiol.* 92, 2859-2866.

- Tan-No, K., Esashi, A., Nakagawasai, O., Nijjima, F., Tadano, T., Sakurada, C., Sakurada, T., Bakalkin, G., Terenius, L., Kisara, K., 2002. Intrathecally administered big dynorphin, a prodynorphin-derived peptide, produces nociceptive behavior through an N-methyl-D-aspartate receptor mechanism. *Brain Res.* 952, 7-14.
- Tan-No, K., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Nijjima, F., Sato, T., Satoh, S., Sakurada, S., Marinova, Z., Yakovleva, T., Bakalkin, G., Terenius, L., Tadano, T., 2005. Pronociceptive role of dynorphins in uninjured animals: N-ethylmaleimide-induced nociceptive behavior mediated through inhibition of dynorphin degradation. *Pain* 113, 301-309.
- Tang, Q., Lynch, R.M., Porreca, F., Lai, J., 2000. Dynorphin A elicits an increase in intracellular calcium in cultured neurons via a non-opioid, non-NMDA mechanism. *J. Neurophysiol.* 83, 2610-2615.
- Vachon, P., Masse, R., Gibbs, B.F., 2004. Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can. J. Vet. Res.* 68, 86-92.
- Wang, Z., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U., Hruby, V.J., Malan, T.P., Jr., Lai, J., Porreca, F., 2001. Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J. Neurosci.* 21, 1779-1786.
- Werz, M.A., Macdonald, R.L., 1985. Dynorphin and neoendorphin peptides decrease dorsal root ganglion neuron calcium-dependent action potential duration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234, 49-56.

- Zachariou, V., Goldstein, B.D., 1997. Dynorphin-(1-8) inhibits the release of substance P-like immunoreactivity in the spinal cord of rats following a noxious mechanical stimulus. *Eur. J. Pharmacol.* 323, 159-165.
- Zhang, L., Hoff, A.O., Wimalawansa, S.J., Cote, G.J., Gagel, R.F., Westlund, K.N., 2001. Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity. *Pain* 89, 265-273.
- Zubrzycka, M., Janecka, A., 2000. Substance P: transmitter of nociception (Minireview). *Endocr. Regul.* 34, 195-201.

3.9. Figure legends

Figure 1. Time course of the histopathological events occurring in the left medial compartment of the femorotibial joint of rats after a single intra-articular injection of 3 mg of monoiodoacetate stained with Safranin O-fast Green. Articular structures of saline-injected control animals demonstrated the presence of proteoglycans in the overall cartilage covering both femur (up) and tibial (bottom) bone structures at days 3 (A) and 28 (G) following the injection. A reduction of proteoglycans stained with Safranin O was observed in both tibial and femoral cartilages 3 days (B), 7 days (C) and 14 days (D) following the MIA injections. At day 21, a severe loss of cartilage was observed with a deformation of the articular surface (E). Similar observations are visible at day 28 (F). Scale Bar = 1 mm.

Figure 2. LC-MS/MS quantitative analysis of a standard peptide mixture using labelled Ac₂O internal standard. Comparison of the observed and nominal concentrations for five standard mixtures of SP (A), CGRP (B), DynA (C) and Big Dyn (D).

Figure 3. Histograms demonstrating the neuropeptides modulation over time in the monoiodoacetate (MIA) rat model. Data represent the relative ratios between MIA injected spinal cord lumbar enlargement concentration versus saline injected control concentration at each time point for substance P (A), calcitonin gene-related peptide (B), dynorphin A (C) and big dynorphin (D) (Mean \pm SD). * = versus control day 3 and ** = versus control day 28.

Table 1: The mass transitions for quantification in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Peptide	Precursor ion	Precursor ion charge state (z)	Product ion	Fragment ion	Collision energy (%)
Substance P	675	2+	254	b ₂	32
			601	b ₁₀ ²⁺	
Acetylated substance P	716	2+	642	b ₁₀ ²⁺	30
CGRP	952	4+	963	b ₂₈ ³⁺	27
			1215	b ₃₆ ³⁺	
Acetylated CGRP	1297	3+	1486	y ₂₈ ²⁺	30
Dynorphin A	716	3+	630	b ₁₅ ³⁺	32
			945	b ₁₅ ²⁺	
Acetylated dynorphin A	759	3+	672	b ₁₅ ³⁺	32
Big dynorphin 1-32	798	5+	700	y ₁₇ ³⁺	32
			945	b ₁₅ ²⁺	

Figure 1

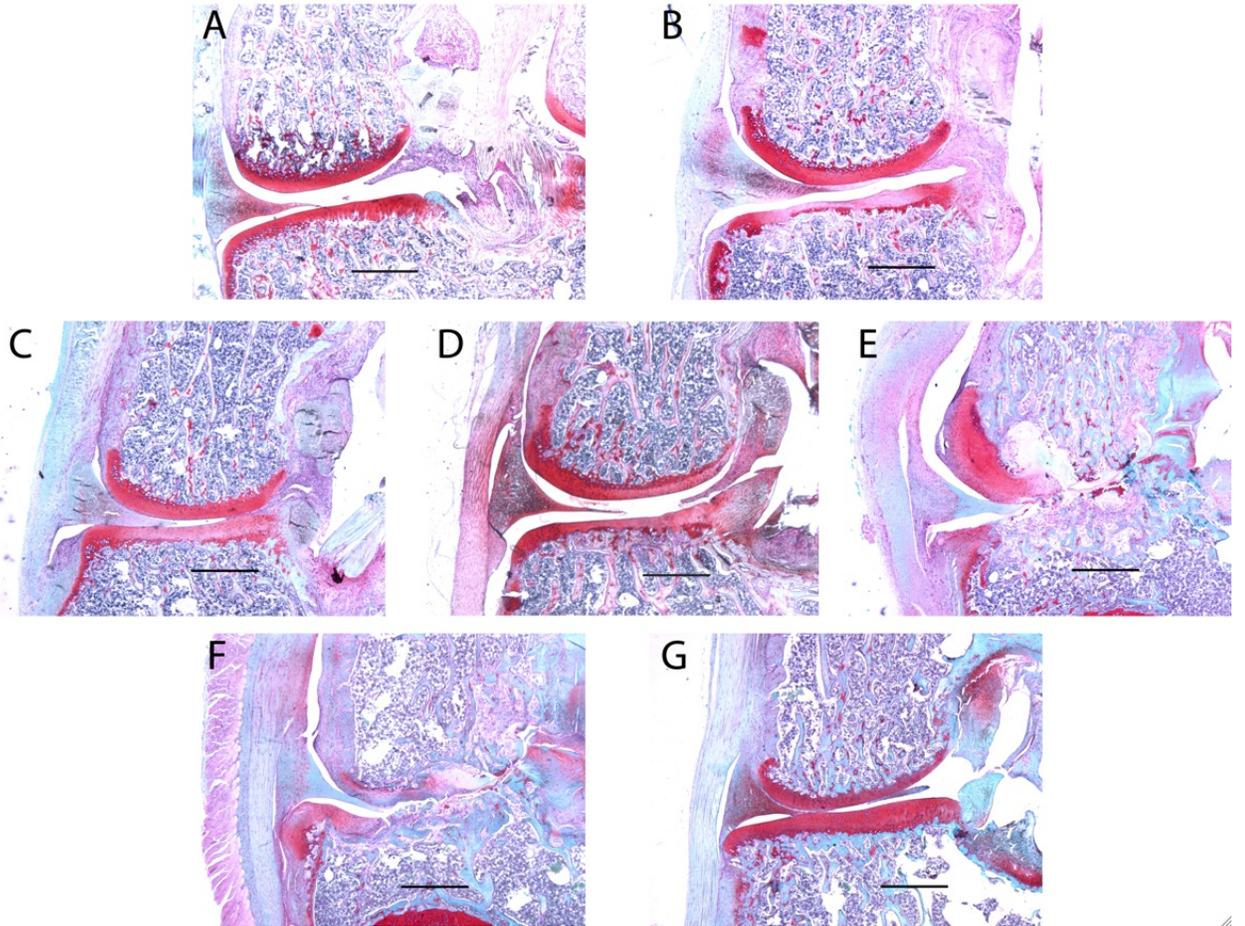


Figure 2

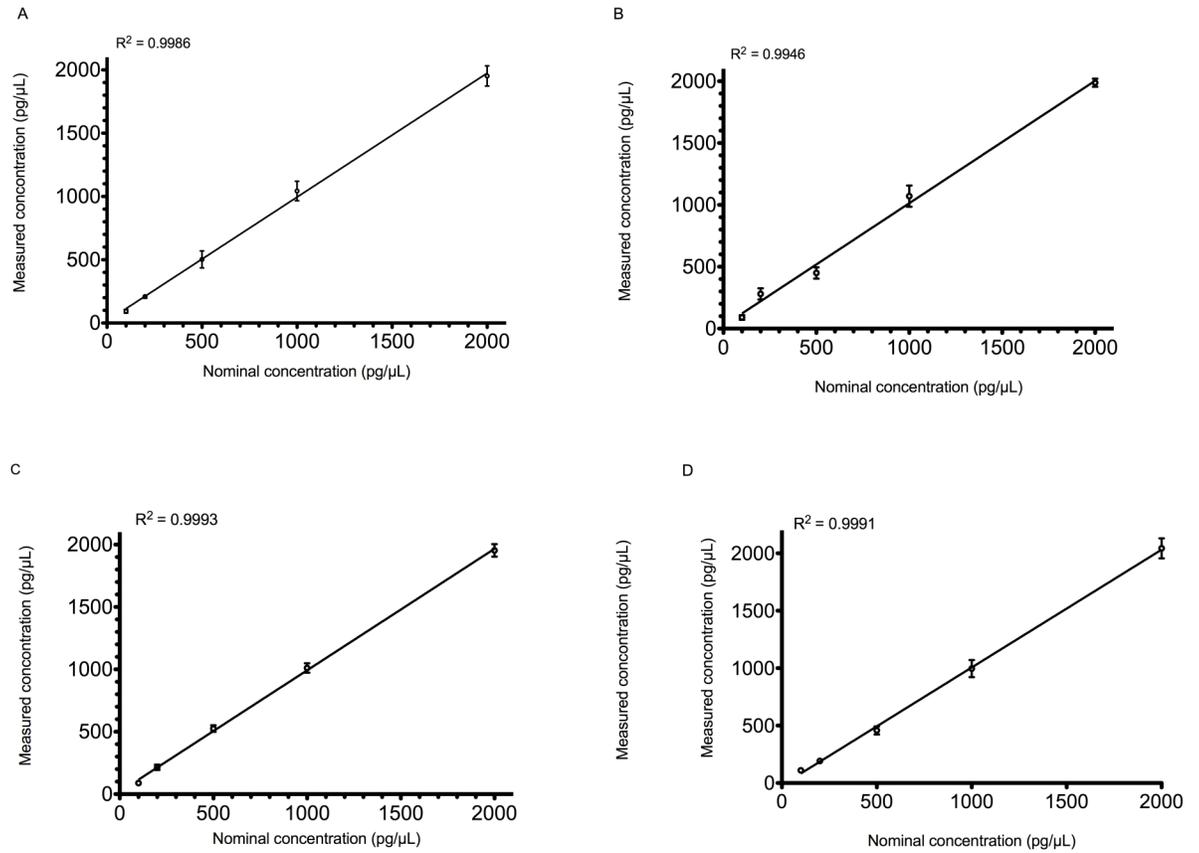
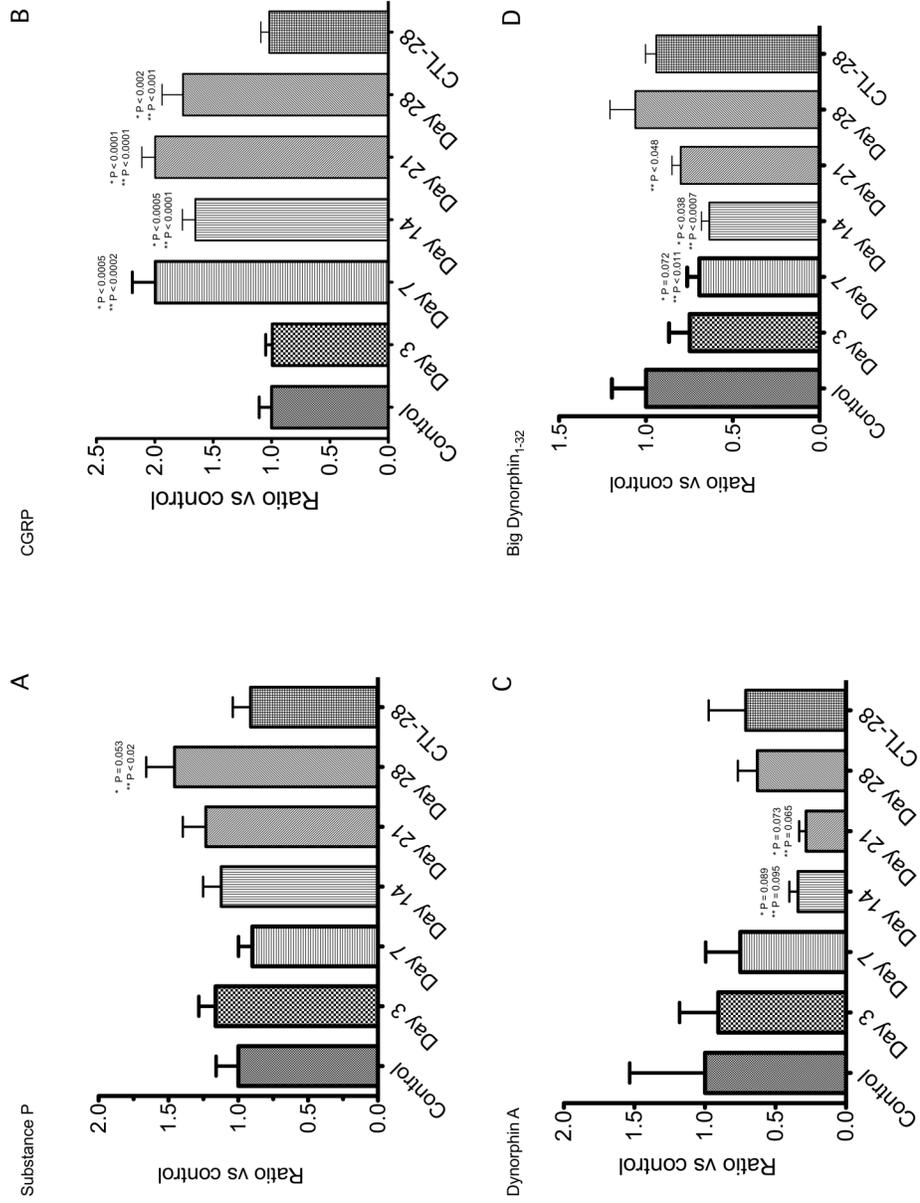


Figure 3



CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Caractérisation du modèle rat de douleur articulaire étudié

Présentement, divers modèles murins sont utilisés lors d'études précliniques évaluant de nouvelles stratégies thérapeutiques. Or, puisqu'aucun consensus sur les modèles employés n'est établi, l'étude de la douleur associée à l'arthrose est très éclectique et conséquemment ardue. Dans la littérature, une dizaine de modèles d'arthrose du grasset de rats est rapportée. Il devient difficile d'approfondir la compréhension des mécanismes endogènes de la nociception lorsque l'on veut comparer différentes molécules en utilisant différents modèles animaux. Il devient donc nécessaire d'améliorer nos connaissances du modèle utilisé par une meilleure caractérisation comportementale, mais aussi biochimique tout au long de la progression de la pathologie. En théorie, il est évident que les modèles animaux qui développent la pathologie de façon spontanée sont le choix idéal pour l'étude de stratégies thérapeutiques potentielles. Par contre, leur coût onéreux ainsi que la longue période de latence avant que ne survienne le début des lésions tissulaires peuvent être des obstacles majeurs pour certaines études. C'est pour cette raison que des modèles d'arthrose induits expérimentalement tels que par des agents chimiques ont vu le jour dans les laboratoires de recherches.

1.1. Justification du modèle d'arthrose utilisé dans le cadre de cette étude

Dans un premier temps, devant l'interrogation non négligeable face au choix du modèle le plus approprié pour l'évaluation de la molécule d'eugénol comme traitement pharmacologique pour diminuer la douleur associée à l'arthrose, une évaluation comparative entre deux modèles couramment utilisés s'est effectuée. Puisque l'objectif était d'évaluer un traitement pour diminuer la douleur, le modèle sélectionné devait démontrer des caractéristiques claires et propres à un comportement présentant de la douleur chez les animaux évalués. Deux modèles murins d'arthrose ont été étudiés durant quatre semaines afin d'évaluer les modifications dans le patron de marche et les réponses

douloureuses conséquentes à la pathologie, tout en observant les lésions articulaires ainsi que la modulation de peptides pronocicepteurs un mois après l'induction de l'arthrose. Le but de cette partie du projet de recherche était d'évaluer ces deux modèles sur une période d'un mois afin de considérer leur utilité lors d'études pharmacologiques de courte durée.

Le modèle chirurgical ACLT+pMMx et le modèle induit par l'injection intra-articulaire de MIA ont été comparés. Ces deux modèles font partie des modèles rats d'arthrose les plus utilisés en recherche préclinique (Gerwin et al., 2010). Le modèle ACLT+pMMx reproduit les événements pathologiques similaires à la pathologie spontanée (Appleton et al., 2007; Hayami et al., 2006). Le développement d'une érosion focale du cartilage sur les régions osseuses qui supportent la charge corporelle survient sur une période d'environ quatre semaines suite à la chirurgie (Gerwin et al., 2010). Pour sa part, le modèle MIA produit des changements tissulaires beaucoup plus rapides et prononcés. Ce modèle est considéré comme étant un modèle de dégénérescence du cartilage causée par la nécrose des chondrocytes induite par l'agent chimique et non un modèle d'arthrose en soi, car il ne reproduit pas les mécanismes naturels de la pathologie. Par ailleurs, le modèle MIA est le plus utilisé pour l'étude de la douleur associée à l'arthrose (Bove et al., 2009). Il était donc intéressant de comparer le comportement des animaux de ces deux modèles afin d'évaluer la différence de réponse douloureuse.

1.2 Justification des évaluations comportementales choisies

1.2.1. Analyse de la démarche à l'aide du CatWalk

L'analyse de la démarche à l'aide de la méthode du CatWalk permet d'évaluer certains aspects cinématiques de la démarche des animaux à l'aide de paramètres dynamiques. Trois paramètres de la démarche ont été retenus pour la présentation des résultats : la durée de la phase d'oscillation, la vitesse d'exécution de la phase d'oscillation ainsi que le ratio entre la durée de la phase d'appui et la durée totale d'un cycle complet

(comprenant les phases d'oscillation et d'appui). Ensembles, ces paramètres permettent de démontrer les changements comportementaux dynamiques en considérant la durée et la vitesse à laquelle l'animal exécute le mouvement avec la patte lésée afin d'initier un autre cycle de marche tout en tenant compte des deux phases d'un cycle complet. Parmi les vingt paramètres que le CatWalk permet d'évaluer, ces trois paramètres se sont avérés les meilleurs indicateurs d'un comportement associé à une réponse douloureuse par l'observation de différences significatives tout au long de l'étude en comparaison aux animaux contrôles. Il aurait été logique de rapporter la durée de la phase d'appui lors de la marche comme indice de douleur puisqu'une diminution du support de la charge par le membre lésé est reconnue comme indicateur de douleur. Or, les résultats obtenus ont démontré une grande variabilité dans la durée de la phase d'appui des animaux, ce qui suggère que ce paramètre n'est pas nécessairement le meilleur à évaluer à l'aide du CatWalk lors de douleur mono-articulaire chez le rat. Par contre, lorsqu'analysée conjointement avec la durée de la phase d'oscillation comme dans le ratio du cycle de marche (en anglais, *duty cycle*), la durée de la phase d'appui devient un paramètre fiable.

Jusqu'à ce jour, seulement deux études publiées ont employé le CatWalk pour l'évaluation de la démarche chez des modèles d'arthrose (Angeby-Moller et al., 2008; Ferreira-Gomes et al., 2008) et aucune ne rapporte le paramètre de phase d'appui. Une étude rapporte l'utilisation du CatWalk pour la phase d'appui statique, et non dynamique, par l'évaluation de l'intensité de la luminosité lorsque la patte de l'animal touche la surface de contact du corridor (Ferreira-Gomes et al., 2008). Or, l'influence du poids corporel des animaux est à considérer pour ce paramètre statique lors d'études longitudinales qui prennent comme valeur comparative la valeur de base initiale. L'intensité de la pause de la patte sur la surface de contact est directement influencée par le poids de l'animal (Gabriel et al., 2009). Il est évident que les animaux évalués ont un gain de poids tout au long de l'étude, donc l'évaluation de ce paramètre à l'aide du CatWalk perd de sa pertinence. La plupart des études évaluant une réponse douloureuse suite à une lésion mono-articulaire rapportent le support de la charge statique comme paramètre principal. Ces études

n'emploient pas nécessairement le CatWalk, mais bien des outils d'évaluation qui permettent de mesurer la distribution du poids corporel soutenu par la patte lésée en comparaison avec la patte controlatérale (test d'incapacité). Ces méthodes sont utilisées comme indice indirect d'inconfort articulaire. L'utilisation d'un de ces tests en parallèle avec l'analyse de la démarche aurait démontré une autre caractéristique de cette réponse douloureuse. Il aurait été intéressant d'observer si la douleur émane davantage lors d'un mouvement de l'articulation lésée ou du membre en position statique, puisque l'intensité de la douleur peut être amplifiée lors d'un mouvement articulaire et parfois soulager lors du repos (absence de mobilisation de l'articulation). Par contre, cette douleur peut être seulement épisodique, parfois constamment présente, telle que rapportée chez des patients humains atteints d'arthrose à un stade avancé (Schaible et al., 2009).

Les résultats obtenus ont démontré que le modèle MIA possède des réponses comportementales associées à la douleur articulaire pour la patte postérieure lésée. L'analyse de la démarche a démontré des différences significatives entre les cycles de marche de chacune des pattes postérieures ce qui permet une identification précise des altérations provoquées par la douleur mono-articulaire. Ces différences se résultent en un patron de marche marqué par une boiterie qui est aussi observée chez les humains atteints d'arthrose du genou (Kaufman et al., 2001). Cette mécanique compensatoire de la démarche est sans doute une altération du patron de marche volontaire de la part de l'animal afin de minimiser le support de la charge sur la patte ipsilatérale, mais aussi une stratégie afin de réduire l'angle de l'articulation lésée lors de période transitoire de flexion-extension qui initie le mouvement de la patte vers l'avant durant la phase d'oscillation. Ainsi, l'animal minimise l'utilisation de l'articulation par un blocage de l'angle articulaire et limite ainsi le moment de torsion du genou inévitable lors du transfert du membre de l'arrière vers l'avant, et peut volontairement diminuer la réponse douloureuse. Pour valider ces spéculations, il faudrait toutefois évaluer l'aspect cinématique angulaire de l'articulation lésée lors du patron de marche en utilisant des marqueurs placés sur les segments corporels constituant l'articulation. Le CatWalk ne permet qu'une évaluation

ventrodorsale de l'articulation et d'autres appareils seraient donc nécessaires pour des analyses plus complètes. En plus de l'analyse de la démarche à l'aide du CatWalk, il aurait été intéressant d'évaluer la motion angulaire de l'articulation lors des phases du cycle de marche chez les deux modèles afin d'identifier les stratégies de compensation de la douleur et d'observer certains détails dans le ralentissement de la vitesse angulaire lors des changements d'angles articulaires. Les animaux pathologiques démontreraient probablement des pauses dans le mouvement circulaire de l'articulation en réponse à la douleur causée par les dommages tissulaires articulaires.

Le modèle ACLT+pMMx a démontré une réponse douloureuse beaucoup moins prononcée que le modèle MIA. Lors de l'analyse de la démarche, ce modèle a révélé employer une tout autre stratégie de marche compensatoire. Lors des premiers jours d'évaluation, la durée de la phase d'oscillation est augmentée et la vitesse d'exécution de la phase d'oscillation ralentie en comparaison aux valeurs de base, et ce pour les deux pattes postérieures. Ces changements dans le patron de marche lors des premiers jours d'évaluation semblent être associés à la période post-chirurgicale. Une période de sept jours a été établie pour la récupération suite à la chirurgie afin d'éviter la collecte de données incluant une douleur associée à cette phase. Or, selon les résultats obtenus, cette période de récupération ne fût pas assez longue et les changements comportementaux lors des premiers jours d'évaluation y seraient associés. Lors de la dernière semaine d'évaluation, les valeurs obtenues pour les deux pattes postérieures pour les trois paramètres sont en opposition avec les valeurs obtenues chez le groupe contrôle. La stratégie utilisée, étant différente en comparaison aux groupes contrôle et MIA, est que les animaux effectuent des petits pas rapides afin de maintenir la cadence et la vitesse. Ceci considérant que tous les groupes d'animaux évalués ont effectué les traversées du corridor à une vitesse similaire. Par ailleurs, l'effet de bilatéralité de la réponse douloureuse a persisté dans le temps. Lorsque le processus d'inflammation persiste, une sensibilisation centrale peut survenir en conséquence de l'activation en continu des nocicepteurs en périphérie. La sensibilisation centrale joue un rôle important dans la progression de la chronicité de la douleur, telle

qu'observée chez les patients atteints d'arthrose (Coutaux et al., 2005), car elle persiste tant et aussi longtemps que l'influx nociceptif persiste (Schaible et al., 2006). Les résultats obtenus suggèrent que l'inflammation retrouvée chez ce modèle altère l'influx sensoriel au niveau de la moelle épinière et que des changements subséquents surviennent controlatéralement. Le modèle ACLT+pMMx semble être affecté par une réponse douloureuse bilatérale observée par des altérations controlatérales dans le patron de marche des animaux. Le fait que la réponse douloureuse soit bilatérale, ce qui n'a pas été observé avec le modèle MIA, est l'élément observé le plus intéressant de ce modèle. L'hypothèse d'une augmentation de la sensibilité mécanique controlatérale est plausible puisque la symétrie est une caractéristique clinique commune lors de pathologie chronique inflammatoire chez l'humain (Kelly et al., 2007; Shenker et al., 2003). Le système nerveux central joue un rôle prédominant dans les réponses controlatérales générées par des mécanismes neuronaux tels qu'une communication synaptique entre des fibres afférentes et des neurones retrouvés dans les laminae de la corne dorsale controlatérale ou encore, la sensibilisation de neurones qui ont des champs récepteurs bilatéraux (Decaris et al., 1999; Shenker et al., 2003). Or, cette hypothèse n'a pu être retenue car les résultats obtenus à l'aide des fils de von Frey ont démontré l'absence de sensibilisation centrale chez le modèle ACLT+pMMx. Donc, les observations de cette étude démontrent la grande différence de modulation de la douleur entre les deux modèles qui est reliée à des mécanismes de nociception distincts. Les différences neurologiques qui influencent la stratégie de compensation lors de la démarche associée aux lésions en périphérie chez ces deux modèles sont d'une grande importance lors d'études expérimentales d'arthrose chez le rat. Par ce projet de recherche, il a été démontré qu'un effet controlatéral présent chez le modèle ACLT+pMMx n'est pas observé chez le modèle MIA. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du membre controlatéral comme élément comparateur pourrait sous-estimer les effets thérapeutiques d'un traitement ainsi que la réponse comportementale associée à la douleur chez le modèle ACLT+pMMx (Shenker et al., 2003). Il est donc plus approprié d'utiliser un groupe d'animaux sains comme contrôle.

1.2.2. Allodynie mécanique secondaire à l'aide des fils de von Frey

Afin de valider l'utilisation du CatWalk comme outil d'évaluation d'un comportement associé à la douleur, l'utilisation en parallèle d'un test comportemental standardisé fût nécessaire. Il est important de savoir si les changements mécaniques observés lors de l'analyse de la démarche sont réellement associés au phénomène de nociception et non simplement à un changement dans le comportement des animaux évalués (peur, anxiété, faim, fatigue, etc.). Le test de von Frey a été employé pour l'évaluation de la réponse douloureuse des animaux associée à un mécanisme central de douleur. Les corps cellulaires des neurones qui innervent la patte et le genou sont co-localisés dans les ganglions de la racine dorsale des segments L2 jusqu'à L6 de la moelle épinière et permettent des interférences à l'intérieur de la moelle qui génèrent la douleur référée (Fernihough et al., 2005). Le modèle MIA a démontré une diminution significative du seuil de retrait de la patte lésée lors de l'évaluation de douleur référée, démontrant ainsi le phénomène central d'allodynie mécanique secondaire (Basbaum et Jessell, 2000; Dickenson, 2004). Cette réponse douloureuse est clairement apparue pour la patte lésée, alors que la patte controlatérale n'a démontré aucun changement significatif de seuil de retrait entre les valeurs pré-induction de l'arthrose et celles rapportées tout au long de l'étude. À l'inverse, le modèle ACLT+pMMx n'a démontré aucune différence significative entre les deux pattes postérieures, à l'exception du dernier jour d'évaluation. À la fin de l'étude, la sensibilité mécanique secondaire est augmentée pour la patte controlatérale. Il n'est pas possible de dire qu'une sensibilisation centrale survient dans ce modèle, puisque la valeur du seuil de retrait de la patte est similaire à la valeur du groupe contrôle ($P > 0.05$). Avec le résultat du dernier jour d'évaluation, ce modèle démontre que des changements neuronaux se mettent en place et peuvent être observés. Cela suggère qu'une période de quatre semaines n'est pas assez longue pour que des changements significatifs soient observés et que ce modèle nécessite une période de temps plus longue pour développer une réponse douloureuse.

Par ailleurs, les perturbations observées dans le patron de la démarche des animaux ainsi que la présence d'allodynie mécanique secondaire n'indiquent pas si la douleur émerge de l'articulation lésée. Il se pourrait que le modèle ACLT+pMMx génère une réponse douloureuse claire si l'évaluation de l'allodynie mécanique s'était effectuée au niveau de l'articulation lésée et non au niveau de la patte. L'allodynie mécanique secondaire est un indicateur de douleur chez le modèle animal de douleur sévère tel que le modèle MIA. Or, l'absence d'allodynie mécanique secondaire n'indique pas qu'il n'y a pas présence de douleur près des lésions articulaires. Il aurait donc été justifié d'effectuer un test comportemental évaluant l'allodynie mécanique primaire là où les dommages structuraux surviennent. Pour cette étude, il a été convenu d'évaluer l'allodynie mécanique secondaire à l'aide du test de von Frey puisque c'est une méthode standardisée reconnue de réponse comportementale douloureuse. L'évaluation de l'allodynie secondaire, et non primaire, était un choix basé sur le fait que chez les patients atteints d'arthrose, la présence de douleur référée dans le membre ipsilatéral pouvant se retrouver jusqu'au niveau du pied est couramment rapportée (Schaible et al., 2009). De plus, des observations non publiées ont permis de conclure que les méthodes d'évaluation de l'allodynie mécanique primaire telles que la mesure de l'application de pression sur l'articulation du genou ou encore le test de flexion-extension de l'articulation (*knee-bend test*) sont des méthodes extrêmement subjectives si l'on considère la variabilité dans la collecte des données effectuée en fonction de la vocalisation (nombre de cris et/ou de tiraillements) des animaux qui est très dépendante du niveau d'anxiété et de stress. L'évaluation la plus appropriée de l'allodynie mécanique primaire serait d'évaluer par électrophysiologie les réponses nociceptives suite à la stimulation mécanique (rotation) de l'articulation comme l'ont démontré Schuelert et McDougall (2006, 2009) avec le modèle MIA.

1.2.3. Conclusion de l'évaluation comportementale des deux modèles

Les différences dans les résultats obtenus avec l'analyse de la démarche et l'évaluation de l'allodynie mécanique secondaire peuvent être attribuées aux divers mécanismes biologiques qui engendrent les réponses comportementales associées à ces deux évaluations. L'analyse de la démarche par le CatWalk engendre une réponse spontanée alors que le test de von Frey engendre une réponse provoquée. Dans ce dernier, l'animal retire la patte loin du stimulus mécanique douloureux qui sensibilise les nocicepteurs cutanés provoqué par l'application du fil. Cette réponse nerveuse implique un circuit réflexe qui comprend la peau de la patte, la moelle épinière et les muscles de la patte. Contrairement à ce que l'on pourrait imaginer étant donné la vitesse de réaction de retrait, cette boucle réflexe de flexion comprend plusieurs synapses afin que la stimulation des nocicepteurs provoque l'excitation des muscles fléchisseurs et l'inhibition des muscles extenseurs du membre (Purves et al., 2001). Après quelques millisecondes, le cerveau reçoit l'information nociceptive et en fait la traduction en une sensation de douleur. Les centres supra-spinaux sont donc considérés comme des joueurs secondaires dans ce type de réponse comportementale. À l'inverse, la réponse douloureuse générée lors de la démarche des animaux est beaucoup plus complexe et nécessite la contribution des circuits spinaux au-delà des réponses réflexes. L'animal qui utilise le membre lésé essaie de maintenir la rythmicité de base des mouvements locomoteurs afin de maintenir sa cadence, et cela par le couplage entre des circuits locaux et des générateurs centraux de rythme (*central pattern generators*, CPGs) qui sont responsables de l'alternance flexion-extension des membres lors de la locomotion (Purves et al., 2001). Le cortex sensorimoteur, le cervelet, les ganglions de la base ainsi que les voies descendantes qui ont leur origine dans le tronc cérébral sont impliqués dans la constante adaptation des mouvements rythmiques engendrés par les CPGs (MacKay-Lyons, 2002; Purves et al., 2001). Ainsi, la perception de douleur et l'influx nociceptif influencent le patron de marche induit par les CPGs. Cela suggère que les modifications observées dans le patron de marche des animaux sont générées par les

centres corticaux et initiées par la sensation consciente de douleur qui attire l'attention des animaux (Gabriel et al., 2009).

Puisque cette étude est une des premières à démontrer l'utilisation du CatWalk pour l'évaluation d'une réponse comportementale associée à de la douleur chez des modèles murins d'arthrose, la validation de cette réponse devait être effectuée afin de pouvoir suggérer que les changements dans la démarche étaient directement reliés à la douleur et non aux changements structuraux dégénératifs ou à la perte d'intégrité structurale normale. Pour se faire, un groupe contrôle positif a été ajouté à l'étude comparative des deux modèles animaux d'arthrose. Les animaux ont reçu un traitement quotidien de célécoxib puisque ce médicament est reconnu pour diminuer la douleur associée à l'arthrose (Pomonis et al., 2005; Stengaard-Pedersen et al., 2004; Tannenbaum et al., 2004). Les résultats obtenus ont démontré une efficacité du traitement observée par l'analyse de la démarche seulement dans les premiers jours d'évaluation. Cela suggère que le célécoxib est efficace lors de la première phase de douleur associée au processus inflammatoire et non lors de la phase de douleur chronique du modèle MIA. Or, les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'allodynie mécanique secondaire ont démontré une efficacité du traitement au niveau central pour les trois premières semaines de l'étude. Cela suggère que le célécoxib module la sensibilisation centrale par son activité inhibitrice de production de PGE_2 dans le SNC et indirectement par l'inhibition de l'activation des protéines kinases qui favorisent l'activation des récepteurs NMDA et mGLU (Seybold et al., 2003). Ainsi, le célécoxib est capable de minimiser le mécanisme de sensibilisation centrale mais non le mécanisme de nociception local, au niveau de l'articulation lésée.

Par ailleurs, les effets positifs du célécoxib sur l'allodynie mécanique secondaire pour la durée complète de l'étude, à l'exception de la dernière semaine, viennent appuyer la validité de la réponse comportementale associée à la douleur observée lors de l'analyse de la démarche.

1.2.4. Évaluation histologique

Quatre semaines suivant l'induction de l'arthrose, le modèle ACLT+pMMx a démontré des changements structuraux associés au stade initial de la pathologie par la présence de lésions focales au niveau du cartilage tels que rapportés par d'autres études (Gerwin et al., 2010). Puisque le cartilage n'est pas innervé, d'autres changements articulaires sont responsables de la présence de modifications dans le comportement des animaux observées lors des évaluations. L'instabilité causée par la rupture du ligament croisé antérieur engendre des déplacements des structures articulaires qui peuvent stimuler des nocicepteurs localisés dans les tissus profonds de l'articulation et qui répondent à des stimuli mécaniques nociceptifs pour ensuite sensibiliser les neurones de la moelle épinière (Schaible et al., 2006). Le modèle MIA a démontré, à 28 jours post-injection de MIA, des lésions articulaires avancées affectant l'os sous-chondral. La structure osseuse est richement innervée et est une source de douleur chez ce modèle (Guzman et al., 2003). Ainsi cette dégénérescence articulaire impliquant particulièrement l'os sous-chondral retrouvée chez ce modèle MIA semble être responsable de la réponse douloureuse plus importante que celle du modèle ACLT+pMMx.

1.2.5. Évaluation de biomarqueurs spinaux de douleur

Quelques peptides associés à la douleur ont été analysés dans les renflements lombaires des moelles épinières des animaux suite à la collecte des articulations. Il est reconnu que la synthèse de neuropeptides est modulée lors de la progression de l'arthrose et les concentrations spinales altérées de ces peptides sont un facteur important dans la modification du processus de transmission et de modulation de la douleur au niveau central (Niissalo et al., 2002). Les concentrations de SP et de CGRP se sont avérées augmentées chez les deux modèles murins, ce qui suggère que la transmission excitatrice provenant de la périphérie a occasionné des changements centraux. Cette augmentation pourrait être attribuée à une augmentation de leur synthèse ou, à l'opposé, à une diminution de leur dégradation. Il a été rapporté que l'expression de l'ARNm codant pour la

préprotachykynine et le CGRP au niveau des ganglions de la racine dorsale de la portion lombaire de la moelle épinière est augmentée suite à une injection périphérique de CFA (Calza et al., 2000; Donaldson et al., 1995), ce qui soutient la première hypothèse puisque la synthèse des neuropeptides est une conséquence directe de l'expression génique (Uhl et Nishimori, 1990). Les neurones peptidergiques sensibilisés expriment le gène spécifique pour la synthèse protéolytique en forte concentration ce qui se manifeste par un niveau élevé d'ARNm du neuropeptide. L'augmentation de l'activité neuronale suite à la lésion périphérique engendre des modifications dans l'expression génique ainsi que des changements prolongés dans le SNC. Les neurones peptidergiques ne possèdent pas de mécanismes de recapture des molécules libérées de SP et de CGRP (Krieger, 1983). Ces molécules sont dégradées par des endopeptidases, et l'augmentation de la concentration spinale de ces deux neuropeptides pourrait aussi être conséquente d'une diminution de leur dégradation dans l'espace intersynaptique.

Il est intéressant d'observer des concentrations élevées des neuropeptides similaires chez les deux modèles alors que les évaluations comportementales ont démontré clairement des différences. Avec une réponse douloureuse quasi inobservée chez le modèle ACLT+pMMx, il aurait été logique d'observer des concentrations de SP et de CGRP semblables au groupe contrôle. Or, les résultats obtenus indiquent qu'il y a bel et bien un phénomène de nociception mis en place chez ce modèle quatre semaines post-chirurgie et qui peut être confirmé par le résultat de l'allodynie mécanique secondaire qui a démontré au dernier jour d'évaluation une baisse du seuil de retrait de la patte lésée. Puisque l'analyse biochimique ne reflétait qu'une image temporelle des événements centraux, il a été proposé par une étude complémentaire d'effectuer une analyse plus approfondie des mécanismes centraux de douleur sur le modèle sélectionné afin d'établir un profil type de l'expression peptidiques lors des divers stades de la pathologie chez le modèle animal.

1.2.6. Conclusion sur la sélection du modèle MIA pour la continuité du projet

En combinant les résultats obtenus des évaluations comportementales, histologiques et biochimiques, il a été conclu que le modèle ACLT+pMMx nécessitait une période beaucoup plus longue que celle établie pour cette étude afin de retrouver une réponse douloureuse claire associée à la progression de la pathologie. Ceci dit, il n'est pas exclu que le modèle ACLT+pMMx soit un bon modèle d'évaluation pour des stratégies thérapeutiques pour diminuer la douleur associée à l'arthrose. Ce modèle est très approprié pour des études pharmacologiques visant une modification des lésions structurales (*disease modifying drugs*). Par contre, pour l'étude de molécules aux propriétés analgésiques, il est impératif d'évaluer le modèle ACLT+pMMx sur une période de temps au delà de quatre semaines afin d'établir ce modèle comme un modèle de douleur reliée à l'arthrose. Puisque l'étude visait à évaluer la douleur, le modèle MIA devenait donc le choix le plus approprié pour la continuité de ce projet. La réponse douloureuse claire ainsi que les changements retrouvés dans le patron de la démarche ne laissent aucun doute sur les effets nociceptifs de l'injection intra-articulaire de MIA. Cela est très important afin d'évaluer rapidement les effets pharmacologiques d'une molécule (*rapid screening of drugs*) aux vertus analgésiques qui pourrait traiter la douleur reliée à l'arthrose. Le but de cette partie de l'étude était d'évaluer ces deux modèles sur une période de quatre semaines afin de considérer leur utilité lors d'études pharmacologiques de courte durée, et non de caractériser ces modèles.

1.3. Caractérisation du modèle MIA

1.3.1. Caractérisation histologique

Le modèle MIA est un des plus utilisés lors d'études précliniques du traitement pharmacologique de douleur associée à l'arthrose (Bove et al., 2009). Les effets de l'injection intra-articulaire de MIA sur les tissus articulaires sont très bien caractérisés dans

la littérature. Plusieurs études ont démontré la dégénérescence tissulaire dans le temps suite à une injection à diverses concentrations allant de 0.03 à 2 mg (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Guzman et al., 2003). Jusqu'à ce jour, aucune étude publiée n'a rapporté les événements histologiques dans le temps (jours 3, 7, 14, 21 et 28) suite à une administration intra-articulaire de MIA à une concentration de 3 mg. Pourtant, cette concentration de MIA injectée est une des plus utilisée lors d'études de douleur articulaire (Beyreuther et al., 2007; Ferreira-Gomes et al., 2008; Schuelert et McDougall, 2008). Notre étude a révélé une augmentation des dommages structuraux en fonction du temps. Les articulations injectées recueillies 3 et 7 jours post-injection ont révélé une diminution progressive de protéoglycanes du cartilage accompagnée d'une nécrose des chondrocytes retrouvés dans le cartilage recouvrant le tibia et le fémur. Au jour 14 post-injection, les articulations injectées ont démontré des lésions similaires aux jours précédents. C'est au jour 21 post-injection que des lésions sévères ont été observées. Une érosion complète du cartilage articulaire exposant l'os sous-chondral et une résorption osseuse étaient présentes dans toutes les articulations évaluées. Par la suite, les changements structuraux observés au jour 28 étaient semblables au jour 21, ce qui suggère que les plus grands changements surviennent trois semaines après l'injection intra-articulaire et qu'ils restent stables par la suite. Même si les effets de l'agent chimique ne permettent pas une progression lente du processus dégénératif observé lors de la pathologie spontanée, ils reproduisent tout de même des changements structuraux similaires à la pathologie de stade sévère (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997; Guzman et al., 2003) qui permettent d'évaluer des traitements thérapeutiques.

Lors de cette évaluation histologique, seuls les dommages au niveau du cartilage et de l'os ont été évalués. Ce choix a été fait en fonction de la littérature qui rapporte ce modèle comme un modèle de douleur nociceptive et neuropathique et non comme un modèle de douleur inflammatoire (Ivanavicius et al., 2007). Donc, aucun indicateur d'inflammation n'a été évalué. Les effets de l'injection sur la membrane synoviale auraient été un élément révélateur pour une éventuelle évaluation d'un traitement anti-inflammatoire

pour l'arthrose. Une distension de la membrane synoviale survient suite à la présence du fluide protéinique de l'œdème contenant des lymphocytes, des neutrophiles, des macrophages et des cellules plasmiques (Bove et al., 2003). Or, chez le modèle MIA, cette réponse inflammatoire se résorbe dans les premiers jours suivant l'injection (Bove et al., 2003; Kalbhen, 1987) pour être complètement disparue 5 jours post-injection (Guzman et al., 2003).

1.3.2. Caractérisation du contenu spinal de neuropeptides spécifiques

Certaines études publiées se sont penchées sur le comportement des animaux suite aux effets de l'injection de MIA à l'aide de tests variés (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007). Or, peu d'études ont essayé de comprendre les événements biochimiques qui génèrent cette réponse douloureuse. Quelques études ont démontré l'implication du neuropeptide CGRP dans la manifestation de la réponse comportementale douloureuse chez le modèle MIA par marquage rétrograde des ganglions dorsaux des fibres afférentes innervant le genou au niveau L4 de la région lombaire de la moelle épinière (Fernihough et al., 2005; Ferreira-Gomes et al., 2010). Puttfarcken et ses collègues (2010) ont évalué la libération endogène de glutamate, de bradykinine, de CGRP et de SP au niveau de la région lombaire de la moelle épinière et ont démontré par des analyses manuelles de plaques filtrantes de 96 puits (*96 plate filter assays*) que les concentrations protéiques étaient augmentées chez les animaux MIA en comparaison à des animaux sains. Mais encore, ces études ne tiennent pas compte de la progression de la lésion, c'est-à-dire que la variation de la modulation des peptides n'est évaluée qu'à un seul moment dans la progression de la pathologie. D'autres études ont établi un profil dans le temps, relativement court, de la modulation de la SP et du CGRP chez des modèles animaux de douleur articulaire (injection de kaoline/carragénine chez le rat et le chat) par des méthodes de marquages immunohistochimiques (Sluka et Westlund, 1993) et de biomolécules sondes capteurs d'affinité à des anticorps spécifiques (*antibody microprobes*) (Schaible et al., 1990). Ces études ont démontré la présence spinale de SP et de CGRP augmentée seulement lors de stimulation mécanique périphérique de l'articulation lésée

suggérant ainsi leur contribution marquée lors de douleur induite par un mouvement articulaire. Ces études sont intéressantes mais ne permettent qu'une identification de biomarqueurs et non une quantification objective.

Notre évaluation de la modulation des neuropeptides sélectionnés a démontré une variation dans le temps en fonction de l'état pathologique du modèle. Les concentrations spinales de CGRP étaient significativement plus élevées dans les moelles épinières des animaux traités au MIA en comparaison aux animaux contrôles, et ceci à partir de 7 jours post-injection jusqu'à la fin de l'étude. Ces résultats sont cohérents avec la réponse comportementale douloureuse prolongée rapportée lors de l'évaluation comportementale du modèle MIA effectuée dans la première partie de ce projet, ainsi que par d'autres études (Fernihough et al., 2004; Pomonis et al., 2005). Dans le système nerveux central, la libération de CGRP augmente les effets du glutamate par des mécanismes impliquant une augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite par l'activation de seconds messagers (protéines kinases, AMP cyclique). Le CGRP est donc responsable de la dépolarisation lente des neurones postsynaptiques qui est engendrée par l'augmentation de leur excitation (Sun 2004, Ebersberger 2000). De plus, la libération de CGRP dans la moelle accroît le processus de libération de SP par les fibres afférentes (Oku et al., 1987). Dans l'ensemble, les résultats obtenus n'ont pas démontré d'augmentations significatives de SP chez les animaux lésés lors du processus de dégénérescence du modèle MIA, mais les données suggèrent une augmentation de la concentration spinale de SP dans le temps. La concentration spinale de SP était par contre significativement plus élevée que celles des animaux contrôles au dernier jour de collecte de données. Ces résultats démontrent que le CGRP contribue de façon significative au développement du processus spinal nocicepteur chez le modèle MIA, alors que la SP semble participer dans le maintien de la nociception et ainsi pourrait contribuer à la chronicité de la douleur associée à l'arthrose. Cette inhibition de libération augmentée de SP lors de l'évolution dans le temps du modèle amène en premier plan l'hypothèse de l'action des peptides opioïdes endogènes.

La dynA, un autre peptide avec des fonctions algogènes, contenue dans les interneurons ainsi que dans les neurones de projection est présente dans la moelle épinière (Dubner et Ruda, 1992). Par l'activation des récepteurs κ situés sur les terminaisons des neurones afférents, la dynA augmente la libération d'endomorphine 2 (EM-2) par les terminaisons des neurones afférents. En conséquence, l'EM-2 active à son tour les récepteurs μ situés sur les neurones de projection mais aussi sur les terminaisons des neurones afférents. Ainsi, cette liaison inhibe la libération de glutamate, de CGRP et de SP dans l'espace intersynaptique et diminue l'excitation du neurone (Fichna et al., 2007) (Figure 1).

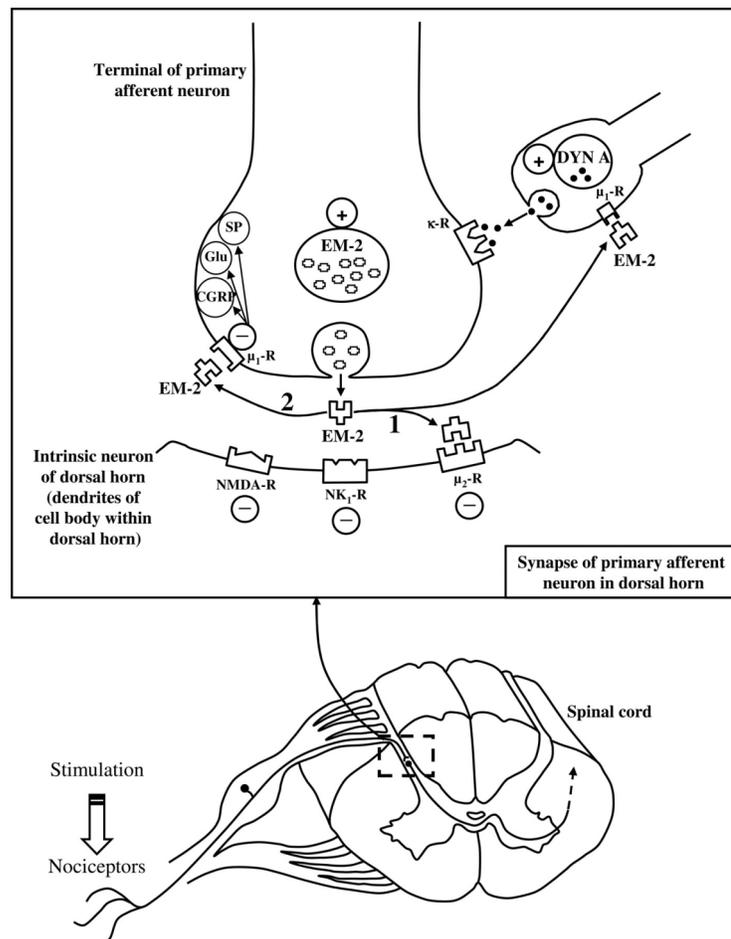


Figure 1. Représentation de certains événements impliquant le système opioïde endogène sur la libération de neuropeptides pronocicepteurs à l'intérieur de la corne dorsale de la

moelle épinière. L'inhibition de la libération de vésicules remplies de glutamate (Glu), de CGRP et de SP se fait par l'interaction entre des molécules d'endomorphine 2 (EM-2) et les récepteurs μ . Le contenu d'EM-2 dans la terminaison nerveuse de la fibre afférente est augmenté par la libération de dynA par les interneurons ou les neurones de projections et son interaction avec les récepteurs κ . Tirée de Fichna et al. 2007.

Nos résultats ont démontré que les concentrations de dynA étaient diminuées jusqu'au jour 21 post-injection, quoique non significativement différentes aux contrôles, donc la dynA n'a pu contribuer au maintien ou à la diminution des concentrations de SP et de CGRP. Cela suggère que l'effet inhibiteur du système opioïde endogène serait inefficace lors de la première phase de douleur chez le modèle MIA. Il est reconnu que la dynA agit comme peptide antinocicepteur par son interaction avec les récepteurs κ (Ko et al., 2000), mais qu'elle agit aussi comme peptide pronocicepteur par son interaction avec les récepteurs NMDA (Laughlin et al., 2001; Tan-No et al., 2005). L'activation des récepteurs NMDA contribue au maintien de la douleur articulaire en augmentant la transmission de l'information nociceptive (Salter, 2005), mais aussi en diminuant la sensibilité neuronale aux molécules agonistes endogènes des récepteurs opioïdes (Bennett, 2000). Malgré le fait que la dynA ait démontré une inhibition réversible de l'activité des récepteurs NMDA, effet similaire au naloxone (Caudle et al., 1994), elle semble bien être impliquée dans les mécanismes facilitateurs de la transmission de la nociception. L'effet pronociceptif de la dynA rapporté précédemment pourrait expliquer les résultats obtenus lors de notre étude.

La Big Dyn a démontré une baisse de concentration significative aux jours 7, 14 et 21 post-injection ($P < 0.05$). Cette diminution peut être due à des modifications post-traductionnelles de la protéine précurseur prodynorphine. Puisque la Big Dyn contient les fragments peptidiques dynA et dynB, cela expliquerait la réduction des concentrations de dynA observée. Les peptides opioïdes sont produits par un processus impliquant les proprotéines convertases 1 et 2 (PC1/PC2) qui sont essentielles pour le processus protéolytique de conversion de la proprotéine inactive en neuropeptides actifs (Perone

1997). Des études utilisant des souris dépourvues du gène codant pour ces protéases ont démontré une réduction de la production de neuropeptides opioïdes tels que l'enképhaline et la nociceptine dans les tissus nerveux (Allen et al., 2001; Miller et al., 2003). Cela implique que d'analyser le contenu spinal des concentrations des neuropeptides suggère seulement une conséquence d'un processus mis en place avant même que le produit final puisse être observé. Donc, la quantification de neuropeptides n'est possiblement pas la seule approche pour l'étude de biomarqueurs de douleur lors de l'arthrose et qu'il serait préférable d'étudier les modifications engendrées dans les réactions enzymatiques pour des applications thérapeutiques potentielles. L'utilisation de stratégies thérapeutiques visant à augmenter ou inhiber l'action de ces enzymes peut être une stratégie afin de minimiser la modulation de la transmission de la douleur. De plus, peut-être que d'activer les mécanismes endogènes de réduction de la douleur plutôt que d'interrompre les voies seraient une meilleure approche pharmacologique.

Le peptide Big Dyn produit également des effets pronociceptifs par son interaction avec les récepteurs NMDA (Tan-No et al., 2002). Sa co-localisation avec le glutamate, la SP et le CGRP amplifie la transmission neuronale impliquant le glutamate et augmente ainsi la libération de SP et de CGRP (Marvizon et al., 2009). Ce mécanisme vient appuyer les résultats de notre étude qui démontrent que la concentration spinale de SP devient significativement augmentée au jour 28 alors qu'au même jour la concentration de Big Dyn augmente, en comparaison aux jours précédents, pour atteindre à nouveau une concentration normale. Mis ensembles, ces données suggèrent que les récepteurs NMDA jouent un rôle très important dans la plasticité neuronale suite à une réponse nociceptive chronique chez le modèle MIA de douleur articulaire. Ainsi, l'utilisation du modèle MIA pour l'étude de molécules antagonistes des récepteurs NMDA comme traitement analgésique est appropriée.

1.3.2.1. Association du contenu spinal des neuropeptides et des lésions tissulaires

L'évolution temporelle des changements structuraux survient relativement rapidement. Alors que ces changements sont déjà visibles trois jours post-injection, les changements du contenu spinal des neuropeptides ne sont devenus significativement différents que sept jours post-injection. Ces résultats sont appuyés par la seconde réponse comportementale douloureuse rapportée chez le modèle MIA (Bove et al., 2003; Combe et al., 2004; Ivanavicius et al., 2007). Il semble ainsi que les événements de la première phase de douleur du modèle soient reliés principalement à la réponse inflammatoire. Dans notre étude, la réponse inflammatoire n'a pas été évaluée spécifiquement. Puisque la SP et le CGRP sont impliqués dans la réponse inflammatoire, il est plausible que leur action biologique au stade initial de la pathologie se focalise en périphérie et que le transport axonal se dirige principalement de façon rétrograde suite à leur synthèse dans les ganglions de la racine dorsale. Les changements structuraux les plus sévères ont été observés dès le 21^{ème} jour post-injection avec l'observation d'une perte complète du cartilage articulaire et la présence d'un remaniement de la structure osseuse. À la fin de l'étude, les concentrations de SP étaient significativement augmentées ce qui suggère que les dommages structuraux activent de façon continue les fibres afférentes peptidergiques, et engendrent ainsi une sensibilisation centrale. Le remaniement de la structure osseuse observé indique une sensibilisation importante des fibres localisées dans cette structure articulaire. Par la perte complète du cartilage articulaire, les fibres localisées dans l'os se retrouvent exposées et deviennent sensibilisées en continue par les stimulations mécaniques, chimiques et thermiques. Les fibres peuvent même être endommagées de façon permanente et générée ainsi une douleur neuropathique qui a précédemment été associée à la réponse douloureuse chez le modèle MIA (Harvey et Dickenson, 2009; Ivanavicius et al., 2007). Cette douleur neuropathique est suggérée par les résultats histologiques et biochimiques et elle serait plus importante que l'on aurait pu croire pour un modèle d'arthrose. Les lésions au niveau des fibres sensorielles lors du processus de dégénérescence mis en place chez ce modèle

semblent être la cause des changements spinaux générant la douleur et non les dommages structuraux de l'articulation en tant que tels. En conclusion, les résultats obtenus indiquent clairement que les évaluations précliniques de molécules analgésiantes utilisant le modèle MIA devraient se concentrer entre les jours 7 et 21 post-injection puisque c'est à ce moment que les lésions ressemblent le plus à celles retrouvées lors de la pathologie humaine. De plus, une attention particulière devrait être portée à l'état pathologique (inflammation, neuropathie) du modèle afin d'évaluer efficacement les effets d'un traitement. Nos résultats suggèrent également que ce ne sont pas les mêmes mécanismes de douleur qui sont générés tout au long de la progression de la pathologie. Il devient ainsi évident qu'un traitement anti-inflammatoire ne parviendra pas à diminuer la douleur lors d'une évaluation à long terme chez ce modèle. Donc, l'efficacité d'un traitement unique et sans modification tout au long du processus de dégénérescence articulaire semble improbable si l'on ne considère pas les modifications temporelles qui surviennent en périphérie et au niveau central.

Lors d'études futures, il serait bien d'apporter certaines modifications dans la méthodologie afin d'accroître la robustesse des résultats. La modulation des neuropeptides a été évaluée à partir de la région lombaire de la moelle épinière puisque les nerfs afférents qui innervent l'articulation du genou se retrouvent dans la région L2-L6 de la moelle (Schaible et al., 2006). Or, puisque les fibres afférentes peptidergiques sont retrouvées dans les laminae superficielles de la corne dorsale, l'utilisation de la moelle épinière complète a sans doute contribué à sous-représenter les valeurs réelles du contenu spinal des neuropeptides par un effet de dilution. Il serait bon d'analyser uniquement la corne dorsale du côté ipsilatéral afin de rapporter des concentrations plus justes de la modulation des peptides. Par contre, en utilisant le tissu complet il a été possible d'effectuer les analyses avec une plus grande quantité de peptides que si seule la corne dorsale, ou encore le liquide céphalorachidien, avait été analysée et ainsi accroître significativement les chances de détection et de quantification. De plus, l'utilisation de la corne dorsale controlatérale pourrait être utilisée comme comparateur, spécialement lors d'observation

comportementale de douleur bilatérale suite à une lésion unilatérale comme observée chez le modèle ACLT+pMMx.

2. Évaluation de l'eugénol comme traitement analgésique pour diminuer la douleur articulaire chez le modèle MIA

Plusieurs études supportent que l'eugénol puisse inhiber certains mécanismes de douleur (Chung et al., 2008; Guenette et al., 2007b; Li et al., 2008). Or, aucune étude n'a suggéré son potentiel thérapeutique pouvant bénéficier les patients atteints d'arthrose. L'eugénol a précédemment démontré des propriétés thérapeutiques variées et lors de notre étude l'eugénol a été évalué comme traitement analgésique chez le modèle MIA de douleur mono-articulaire. Une administration orale quotidienne à long terme d'eugénol a démontré une atténuation de la réponse comportementale douloureuse observée par une diminution de la boiterie dans le patron de la démarche des animaux traités. Les animaux traités avec l'eugénol à une dose de 40 mg/kg ont démontré un patron de marche des pattes postérieures semblables au patron de marche pré-induction de l'arthrose. Ces effets ont été observés seulement lors des deuxième et troisième semaines d'évaluation. Ces résultats sont une conséquence des effets sur différents mécanismes de douleur rapportés. Le modèle MIA génère deux phases distinctes de douleur, une étant associée à la mise en place des lésions tissulaires ainsi que la réponse inflammatoire en découlant et l'autre au processus de dégénérescence des structures articulaires. Cette dernière est associée à une réponse comportementale douloureuse beaucoup plus prononcée (Bove et al., 2003). La première phase qui engendre une réponse inflammatoire survient suite à l'injection de MIA et se résorbe complètement après une semaine (Guingamp et al., 1997). L'eugénol qui est un agent anti-inflammatoire inhibant l'activité des COXs et la production de PGs (Dewhirst, 1980; Markowitz et al., 1992) peut modifier la réponse douloureuse chez le modèle MIA lors de la phase initiale de douleur associée à la réponse inflammatoire. Ces résultats

confirment les effets anti-inflammatoires par l'inhibition de certains médiateurs de l'inflammation de l'eugénol observés. Donc, l'eugénol pourrait être un traitement alternatif aux AINS. Ces derniers sont associés à des effets néfastes sur le système gastro-intestinal. Il était donc nécessaire d'évaluer les effets toxiques potentiels d'un traitement continu à base d'eugénol. L'évaluation histopathologique des organes recueillis suite à l'étude de l'administration de la dose journalière de 40 mg/kg pour une période de quatre semaines n'a démontré aucun signe de toxicité par l'absence de lésion, et plus particulièrement aux niveaux rénal et gastro-intestinal. Ceci suggère que l'eugénol pourrait être bénéfique dans le traitement de la douleur articulaire chronique telle que lors de l'arthrose sans effet néfaste. Par contre, il faut reconnaître que malgré cette vision optimiste d'un traitement à base d'eugénol, une évaluation plus exhaustive doit être effectuée sur d'autres espèces animales et sur d'autres paramètres physiologiques et pharmacologiques. Des effets toxiques (insuffisance hépatique, dépression du SNC) ont été rapportés suite à une ingestion d'huile de clou de girofle concentrée chez des humains, mais ces effets sont survenus suite à des surdoses aiguës accidentelles (approximativement 10 mL PO chez des enfants de moins de 2 ans) (Eisen et al., 2004). Une étude a démontré chez des rats que l'eugénol est métabolisé par les hépatocytes et que les effets cytotoxiques rapportés sont dus à des réactions oxydatives impliquant le glutathion (Thompson et al., 1991). Or, chez des souris, ces effets cytotoxiques n'ont été observés que suite à une administration orale de 600 mg/kg, alors qu'une dose de 800 mg/kg cause la mort des animaux traités en moins de trois heures (Mizutani et al., 1991). Ces études démontrent une toxicité à très forte dose seulement. L'eugénol est néanmoins classé comme molécule sécuritaire pour ingestion par la *US Food and Drug Administration* (US-FDA) depuis 1978 (Fischer et al., 1990).

Une caractérisation pharmacologique à l'aide de molécules analgésiques du modèle MIA a été rapportée en fonction d'évaluations comportementales autres que l'analyse de la démarche à différents temps. Il est rapporté que lors de la première phase de douleur, ce modèle est sensible aux AINS (Bove et al., 2003). Par contre, lors de la seconde phase de douleur, les effets des AINS sélectifs à la COX-2 ne sont plus efficaces (Fernihough et al.,

2004; Pomonis et al., 2005). Nous avons obtenus des résultats similaires avec le célécoxib durant la première phase de douleur avec le modèle MIA. De plus, le célécoxib n'a démontré aucune efficacité à diminuer la réponse comportementale douloureuse lors de la phase de douleur chronique du modèle tant par l'analyse de la démarche que par l'observation de l'allodynie mécanique secondaire. L'absence de réponse inflammatoire suite aux premiers jours post-injection ainsi que l'inefficacité des AINS lors de la seconde phase de douleur avec le modèle MIA démontre clairement que l'inflammation n'est pas responsable de la réponse comportementale douloureuse et que ce modèle n'est pas un modèle de douleur inflammatoire. Cela semble justifier l'absence de différences significatives de l'effet analgésique de l'eugénol en comparaison au groupe d'animaux traités avec le véhicule pour la totalité de la première phase de douleur pour l'analyse de la démarche.

L'effet analgésique le plus important de l'eugénol est survenu suite à trois semaines de traitement quotidien, alors qu'une amélioration du patron de marche et une diminution d'allodynie mécanique secondaire ont été observées. Cela suggère un effet analgésiant accentué lorsque la douleur devient chronique. Cet effet peut être dû au processus dégénératif des structures articulaires du modèle MIA. Trois semaines suivant l'injection de MIA, il y a un remodelage important de l'os sous-chondral tel qu'observé lors de l'évaluation histopathologique effectuée pour l'étude temporelle de caractérisation du modèle. Même si l'évaluation histopathologique ne rapportait pas précisément les détails des changements qui sont survenus, il a pu être observé que les changements prédominants surviennent entre les jours 14 et 21. Au jour 21, la structure osseuse est complètement mise à nue en l'absence de cartilage et s'accompagne du développement d'ostéophytes. La destruction osseuse associée à la pathologie est en partie générée par les cytokines. Puisqu'il a été démontré précédemment que le resvératrol, un composé phénolique similaire à l'eugénol, est capable d'inhiber la production de ces cytokines (Marier et al., 2005), l'eugénol pourrait bloquer la libération de ces médiateurs responsables de ce remaniement osseux (Lee et al., 2007). Lors de ce stade avancé de la pathologie en termes

histopathologiques, les terminaisons nerveuses libres des fibres afférentes sont exposées à l'espace articulaire et toute stimulation, qu'elle soit chimique ou biomécanique, les sensibilise. Au delà de la sensibilisation, il est suggéré que ces fibres soient endommagées et engendrent ainsi l'apparition de douleur neuropathique (Harvey et Dickenson, 2009; Ivanavicius et al., 2007). L'eugénol est reconnu être un agent efficace pour diminuer la sensibilité douloureuse chez un modèle de douleur neuropathique (Guenette et al., 2007b; Yeon et al., 2011), et pourrait agir de la même façon avec ce modèle animal de douleur articulaire. Par ailleurs, il est important de souligner à nouveau les réponses variantes du modèle MIA en fonction de la dose de MIA injectée dans l'articulation puisque la réponse douloureuse en est conséquente (Schuelert et McDougall, 2009). La faiblesse des résultats obtenus pour l'eugénol lors de l'évaluation comportementale peut en être directement associée. Suite à une injection intra-articulaire de 3 mg/kg de MIA, les dommages structuraux sont très sévères et associés à une sensibilisation des fibres afférentes. Cette augmentation grandement amplifiée de l'activité neuronale due à une diminution du seuil de sensibilisation des fibres afférentes et suite à une stimulation mécanique peut être devenue beaucoup trop importante pour le traitement proposé dans ce projet. Puisque la relation directe entre la dose injectée de MIA et la réponse comportementale douloureuse a été rapportée précédemment, il serait justifier d'évaluer l'efficacité de traitement des deux doses d'eugénol évaluées sur un modèle MIA de plus faible concentration (< 3 mg).

À la toute fin de l'évaluation comportementale, la réduction de l'allodynie mécanique secondaire ne s'est observée que suite à l'administration de la plus faible dose d'eugénol, et aucune différence n'a été observée dans les patrons de marche des animaux traités au salin et à l'eugénol (les deux doses). L'activité analgésique de l'eugénol à une dose de 20 mg/kg peut être expliquée en partie par ses propriétés pharmacologiques. Il est possible que des administrations répétées d'eugénol 20 mg/kg aient causé un effet d'accumulation au niveau des récepteurs à l'intérieur de la corne dorsale de la moelle suite à la longue période de traitement, alors que la dose de 40 mg/kg aurait plutôt occasionnée

un effet de saturation des récepteurs. L'absence d'effet de l'eugénol 40 mg/kg observée par la diminution du seuil de retrait de la patte lors de la stimulation mécanique, qui démontre clairement que les animaux sont allodyniques, est en contradiction avec la diminution du contenu spinal des neuropeptides pronocicepteurs observée en comparaison aux animaux traités au salin. Le blocage des récepteurs TRPV1 par un antagoniste atténuant la libération spinale de SP (Tang et al., 2008) et l'action de l'eugénol au niveau du système nerveux central (Lionnet et al., 2010) peuvent expliquer les résultats obtenus. Puisque le CGRP est co-localisé à l'intérieur des mêmes fibres afférentes de l'articulation avec la SP (Salo et Theriault, 1997), une diminution des concentrations de CGRP et de SP peut résulter en une baisse de l'activité neuronale. Les résultats de la régulation des peptides à l'intérieur de la moelle mesurée seulement à la fin de l'étude ont démontré un effet positif continu de l'eugénol à une dose de 40 mg/kg observé par la diminution des concentrations de SP et de CGRP.

La contradiction entre ces résultats et ceux de l'allodynie mécanique secondaire suggère que l'eugénol à 40 mg/kg diminue le contenu spinal de certains peptides pronocicepteurs mais que d'autres mécanismes sont impliqués dans le phénomène de sensibilisation centrale. Les concentrations de dynA observées chez les animaux traités en comparaison au groupe témoin peuvent être une conséquence de la diminution du message pronociceptif modulé par les fibres afférentes peptidergiques. Cela suggérerait un rôle pronociceptif de la dynA dans la modulation de la douleur associée à l'arthrose chez le modèle MIA. L'effet pronociceptif de la dynA se fait par l'interaction avec les récepteurs NMDA (Tan-No et al., 2005) et les récepteurs à la bradykinine (Lai et al., 2006), ce qui induit l'influx de Ca^{2+} à l'intérieur des neurones sensoriels. Ainsi, l'activité inhibitrice de l'eugénol sur les canaux calciques (Lee et al., 2005) pourrait être diminuée par la production accrue de dynA. Le traitement d'eugénol à 40 mg/kg peut aussi avoir des répercussions sur d'autres neurotransmetteurs et récepteurs impliqués dans la transduction de l'information nociceptive et qui contribuent au maintien de l'état chronique de la douleur associée à la pathologie. D'ailleurs, une étude récente démontre que les effets

antinociceptifs de l'eugénol suite à une administration orale chez la souris impliqueraient aussi les récepteurs opioïdes μ ainsi que les récepteurs α_2 -adrenergiques (Park et al., 2011). Ainsi, lors d'une étude future, il serait donc intéressant d'analyser le contenu spinal de peptides opioïdes endogènes autres que la dynorphine tels les enképhalines ou les endorphines.

Après avoir effectué la caractérisation temporelle du modèle MIA, il devient évident que l'évaluation des concentrations de neuropeptides de la moelle à un seul temps ne donne pas suffisamment d'information sur les événements qui surviennent, mais plutôt un indice de l'efficacité de la molécule d'eugénol lorsque le modèle est bien établi. L'idée d'approfondir les connaissances des mécanismes centraux de douleur chez le modèle MIA est survenue à la suite de l'étude évaluant le potentiel thérapeutique de l'eugénol. Il serait pertinent d'évaluer la modulation des neuropeptides dans le temps par l'eugénol afin de mieux comprendre les conséquences d'une administration répétée d'eugénol sur les mécanismes neuronaux et peut-être même d'observer une relation possible entre ces changements biochimiques et les modifications de la réponse comportementale douloureuse.

La présente étude ne s'est pas concentrée sur les effets protecteurs de l'eugénol sur les structures articulaires pour évaluer son efficacité en tant que traitement thérapeutique aux vertus stabilisantes de la pathologie. D'autres molécules vanilloïdes comme la curcumine (Henrotin et al., 2010; Shakibaei et al., 2007) et le gingembre (Shen et al., 2003) ont démontré des propriétés protectrices des chondrocytes limitant ainsi les dommages au niveau du cartilage. L'eugénol aurait potentiellement pu démontrer des effets similaires. Or, les articulations ont été recueillies seulement à la fin de l'étude. À ce moment, le processus de dégénérescence tissulaire est très avancé et la présence de cartilage est parfois inexistante. Il est alors impossible d'évaluer ces effets à ce temps d'observation. Il serait toutefois intéressant d'observer les effets de l'eugénol dans le temps et ce, à partir du processus initial de la pathologie jusqu'au stade avancé et sévère. Peut-être que l'eugénol possède des propriétés chondroprotectrices qui pourraient être observées lors de lésions

moins sévères que celles observées quatre semaines suite à l'injection de MIA. Les effets pourraient être modestes mais efficaces lors d'un stade primaire de la pathologie. Puisque l'eugénol inhibe la production de médiateurs inflammatoires, il serait également intéressant d'évaluer si une administration orale d'eugénol comme traitement préventif pourrait minimiser la réponse inflammatoire retrouvée lors du stade initial de la pathologie.

La collecte des articulations à la fin de l'étude, lors du stade avancé du modèle MIA, s'est effectuée afin de confirmer que les effets analgésiques de l'eugénol soient bien attribués à ses effets sur les mécanismes neuronaux et non à des effets sur les tissus. Chez les animaux traités avec l'eugénol, les dommages au niveau du cartilage étaient significativement plus sévères que chez les animaux traités au salin. Les animaux ressentant moins de douleur au niveau de l'articulation ont pu augmenter leur amplitude de mouvement angulaire ainsi que le support de la charge avec l'articulation lésée et ainsi modifier l'emplacement du support de la charge. La douleur est un mécanisme de protection qui incite à minimiser l'utilisation fonctionnelle de l'articulation afin d'en diminuer le support de la charge associée. Des études longitudinales évaluant l'utilisation d'AINS chez des patients humains atteints d'arthrose du genou ont démontré que le soulagement de la douleur est accompagnée d'une amélioration de la performance et de l'utilisation de l'articulation lors de la marche (Hurwitz et al., 2002; Schnitzer et al., 1993). Tout comme ces études, la diminution de douleur observée lors de l'analyse du patron de la démarche des animaux traités avec l'eugénol suggère qu'une diminution de la perception de la douleur occasionne des dommages structuraux plus sévères et conséquemment une accélération de la progression de la pathologie. Ceci soulève un point non négligeable de discussion dans la pertinence de l'étude de traitements analgésiques et de l'outil d'évaluation utilisé, spécialement dans l'optique d'un traitement clinique éventuel. L'analyse de la démarche se révèle être un outil incontournable car elle permet d'évaluer les changements de stratégies compensatoires et non seulement les changements neuronaux occasionnés par la prise du traitement analgésique souvent évalués par des tests statiques qui ne démontrent pas les effets pratiques.

De façon générale, les résultats obtenus suggèrent que le mécanisme d'action de l'eugénol comme traitement analgésique n'est pas encore élucidée. Il serait très intéressant d'évaluer l'efficacité de l'eugénol en périphérie par une application topique sur l'articulation lésée. Puisque la capsaïcine a démontré des effets antinociceptifs par un tel traitement (Towheed et Hochberg, 1997), l'eugénol pourrait démontrer un effet similaire. Par contre, la sensation de brûlure soutenue durant les heures, parfois même les jours, suivant l'application qui est rapportée par les patients lors d'études cliniques en Phase II remet en cause la commercialisation de ce traitement (Wong et Gavva, 2009). Par ailleurs, la capsaïcine a des effets toxiques allant jusqu'à la mort cellulaire par un influx amplifié d'ions Ca^{2+} . L'eugénol ne provoquerait pas des effets similaires puisque son action sur les canaux Ca^{2+} est beaucoup moins importante (Chung et al., 2008; Lee et al., 2005). Un traitement suivant l'identification d'une dose acceptable pourrait activer lentement les récepteurs TRPV1 de façon réversible tout en inactivant rapidement les Ca_v et les Na_v . Ces suggestions d'études futures ne font que refléter le travail nécessaire qu'il reste à effectuer avant de pouvoir énoncer que l'eugénol est un traitement efficace pour pallier la douleur articulaire associée à l'arthrose. Il est à espérer que cette molécule continuera d'attirer l'attention de chercheurs tout comme d'autres molécules vanilloïdes aux propriétés pharmacologiques reconnues.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

L'arthrose est la pathologie de dégénérescence articulaire la plus commune et affecte plus de 50% des gens âgés de 65 ans et plus (Bove 2009). Cette pathologie est caractérisée par un stade initial de dégradation du cartilage articulaire et de changements à l'intérieur de la structure osseuse. Les modifications des structures articulaires engendrent une modification dans le support de la charge et sensibilisent les fibres afférentes sensorielles retrouvées dans l'articulation. Les gens atteints d'arthrose au niveau de l'articulation du genou ressentent de la douleur lors du support de la charge corporelle avec le membre lésé mais aussi lors de la mobilisation de l'articulation. Afin de minimiser la perception de douleur générée par ces changements, des modifications dans le patron de la démarche sont occasionnées pour diminuer la douleur ressentie.

Dans un premier temps, un modèle rat de douleur articulaire aux caractéristiques similaires retrouvées lors de la pathologie humaine a été sélectionné. Le modèle rat induit par une injection intra-articulaire de mono-iodoacétate (MIA) engendre une boiterie observée dans le patron de la démarche des animaux qui est caractéristique à une lésion articulaire unilatérale telle que couramment observée chez les humains. Par une évaluation du seuil de retrait de la patte suite à une stimulation mécanique, la présence du phénomène d'allodynie mécanique secondaire a démontré un état de douleur prolongée par la présence d'une sensibilisation centrale chez ce modèle. L'évaluation temporelle des changements spinaux de la modulation de la douleur a révélé des événements hétérogènes dans la régulation des concentrations de neuropeptides jouant un rôle majeur dans la nociception. Lors des sept premiers jours suivant l'induction, aucun changement spinal n'a été observé ce qui suggère que les événements initiaux chez le modèle MIA sont en majorité périphériques et qu'aucun mécanisme de sensibilisation centrale n'est mis en place à ce moment. Les changements neuronaux centraux sont survenus lorsque les lésions articulaires ont démontré, par l'observation histologique, une perte complète du cartilage articulaire ainsi que des lésions au niveau de l'os. Les fibres afférentes ainsi exposées sont sensibilisées de façon continue et laissent suggérer que la composante neuropathique de la douleur chez ce modèle est très importante durant la seconde phase de douleur. Cette

caractérisation temporelle des événements générant la réponse comportementale douloureuse permet une meilleure identification des mécanismes impliqués dans la nociception chez ce modèle animal en fonction de la dégénérescence des tissus en périphérie. Ainsi, lors de l'évaluation d'une molécule thérapeutique, il est suggéré de considérer ces événements distincts qui déterminent les différences physiologiques de douleur chez ce modèle afin de maximiser le potentiel analgésiant de la molécule.

Dans un second temps, les effets analgésiques de l'eugénol ont été évalués à l'aide du modèle MIA. L'eugénol administré quotidiennement par voie orale a démontré un potentiel thérapeutique suite à une étude comportementale des animaux traités pour une période de quatre semaines. Les animaux traités ont démontré un cycle de marche similaire pour les deux pattes postérieures ce qui signifie que l'eugénol a un effet positif sur la mobilisation de l'articulation démontré par une amélioration du patron de marche pathologique. De plus, l'eugénol a démontré une efficacité pour diminuer la présence d'allodynie mécanique secondaire ainsi que pour diminuer le contenu spinal des concentrations de molécules algogènes. Néanmoins, ces effets restent modestes dans leur ensemble. Plusieurs facteurs peuvent en être la cause dont une concentration de MIA injectée dans l'articulation trop élevée et générant des lésions trop sévères pour pallier la réponse comportementale douloureuse de façon efficace. Le manque de compréhension des mécanismes physiologiques responsables de la douleur chez le modèle utilisé peut aussi expliquer le manque de robustesse dans l'efficacité d'un traitement de longue durée de l'eugénol. La caractérisation du modèle MIA s'est effectuée suite à l'évaluation des effets analgésiques de l'eugénol et les indicateurs concernant les événements biochimiques et histologiques rapportés précédemment n'ont pu être pris en considération. L'eugénol a tout de même démontré des propriétés analgésiques avec le modèle MIA.

Dans les pays développés, les traitements analgésiques synthétiques préoccupent les cliniciens, et les patients atteints d'arthrose, suite aux rapports de conséquences négatives impliquant des effets secondaires non désirés ainsi que l'inefficacité de traitement à long terme. C'est pourquoi un engouement de la population générale pour les remèdes naturels,

principalement à base d'extraits de plante, a vu le jour. Les dérivés de plantes qui possèdent des propriétés thérapeutiques peuvent être une alternative sécuritaire et moins onéreuse que les médicaments synthétiques conventionnels. Par contre, ce n'est pas parce qu'une molécule est naturelle qu'elle est systématiquement sécuritaire. Cette étude a démontré un potentiel thérapeutique d'une molécule de la famille des vanilloïdes, l'eugénol, pour le traitement de la douleur associée à l'arthrose. Beaucoup de travail reste à faire avant de pouvoir dire que l'eugénol est un traitement efficace pour pallier la douleur articulaire, mais il est déjà possible d'entrevoir le potentiel de cette molécule comme traitement complémentaire. Il serait pertinent d'étudier et de caractériser ses effets analgésiques sur d'autres modèles animaux et aussi d'évaluer son efficacité comme traitement préventif tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

Bibliographie

- Abramson, S. B. (2004). The role of NSAIDs in the treatment of osteoarthritis. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 251-258). New York: Oxford University Press.
- Ahmed, M., Bjurholm, A., Schultzberg, M., Theodorsson, E., et Kricbergs, A. (1995). Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 38(5), 699-709
- Aigner, T., Cook, J. L., Gerwin, N., Glasson, S. S., Lavery, S., Little, C. B., McIlwraith, W., et Kraus, V. B. (2010). Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18 Suppl 3, S2-6
- Allard, P., et Blanchi, J.-P. (2000). *Analyse du mouvement humain par la biomécanique*. (2^e éd.). Montréal: Vigot.
- Allen, R. G., Peng, B., Pellegrino, M. J., Miller, E. D., Grandy, D. K., Lundblad, J. R., Washburn, C. L., et Pintar, J. E. (2001). Altered processing of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 5864-5870
- Altman, R. D., et Marcussen, K. C. (2001). Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 44(11), 2531-2538
- Anderson-MacKenzie, J. M., Quasnicka, H. L., Starr, R. L., Lewis, E. J., Billingham, M. E., et Bailey, A. J. (2005). Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(1), 224-236

- Andriacchi, T. P., Koo, S., et Scanlan, S. F. (2009). Gait mechanics influence healthy cartilage morphology and osteoarthritis of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery, 91 Suppl 1*, 95-101
- Andriacchi, T. P., Mundermann, A., Smith, R. L., Alexander, E. J., Dyrby, C. O., et Koo, S. (2004). A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Annals of Biomedical Engineering, 32*(3), 447-457
- Angeby-Moller, K., Berge, O. G., et Hamers, F. P. (2008). Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and rofecoxib. *Journal of Neuroscience Methods, 174*(1), 1-9
- Antman, E. M., Bennett, J. S., Daugherty, A., Furberg, C., Roberts, H., et Taubert, K. A. (2007). Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation, 115*(12), 1634-1642
- Aoshima, H., et Hamamoto, K. (1999). Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63*(4), 743-748
- Appleton, C. T., McErlain, D. D., Pitelka, V., Schwartz, N., Bernier, S. M., Henry, J. L., Holdsworth, D. W., et Beier, F. (2007). Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther, 9*(1), R13
- Arnoldi, C. C., Lemperg, K., et Linderholm, H. (1975). Intraosseous hypertension and pain in the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume, 57*(3), 360-363
- Arora, P. S., Yamagiwa, H., Srivastava, A., Bolander, M. E., et Sarkar, G. (2005). Comparative evaluation of two two-dimensional gel electrophoresis image analysis

software applications using synovial fluids from patients with joint disease. *Journal of Orthopaedic Science*, 10(2), 160-166

Astephen, J. L., Deluzio, K. J., Caldwell, G. E., Dunbar, M. J., et Hubley-Kozey, C. L. (2008). Gait and neuromuscular pattern changes are associated with differences in knee osteoarthritis severity levels. *Journal of Biomechanics*, 41(4), 868-876

Azuma, Y., Ozasa, N., Ueda, Y., et Takagi, N. (1986). Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *Journal of Dental Research*, 65(1), 53-56

Barone, R. (1989). *Anatomie comparée des mammifères domestiques, Arthrologie et myologie*. (3^e éd.). Paris: Éditions Vigot.

Barone, R., Pavaux, C., Blin, P. C., et Cuq, P. (1973). *Atlas d'anatomie du lapin*. Paris: Masson & Cie.

Barve, R. A., Minnerly, J. C., Weiss, D. J., Meyer, D. M., Aguiar, D. J., Sullivan, P. M., Weinrich, S. L., et Head, R. D. (2007). Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(10), 1190-1198

Basbaum, A. I., et Jessell, T. M. (2000). The Perception of Pain. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (4^e éd., p. 472-491). USA: McGraw-Hill

Beaudry, F. (2010). Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry-based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Analytical Biochemistry*, 407(2), 290-292

Beaudry, F., Ferland, C. E., et Vachon, P. (2009). Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography

electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 23(9), 940-950

Belcaro, G., Cesarone, M. R., Dugall, M., Pellegrini, L., Ledda, A., Grossi, M. G., Togni, S., et Appendino, G. (2010). Efficacy and safety of Meriva(R), a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients. *Alternative Medicine Review*, 15(4), 337-344

Bennett, G. J. (2000). Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *Journal of Pain and Symptom Management*, 19(1 Suppl), S2-6

Bernstein, J. E., Korman, N. J., Bickers, D. R., Dahl, M. V., et Millikan, L. E. (1989). Topical capsaicin treatment of chronic postherpetic neuralgia. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 21(2 Pt 1), 265-270

Beyreuther, B., Callizot, N., et Stohr, T. (2007). Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther*, 9(1), R14.doi:ar2121 [pii]

10.1186/ar2121

Bliddal, H., Rosetzsky, A., Schlichting, P., Weidner, M. S., Andersen, L. A., Ibfelt, H. H., Christensen, K., Jensen, O. N., et Barslev, J. (2000). A randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extracts and ibuprofen in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(1), 9-12

Bove, S. E., Calcaterra, S. L., Brooker, R. M., Huber, C. M., Guzman, R. E., Juneau, P. L., Schrier, D. J., et 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 Cartilage*, 11(11), 821-830

- Bove, S. E., Flatters, S. J., Inglis, J. J., et Mantyh, P. W. (2009). New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev*, 60(1), 187-201
- Bozkurt, A., Deumens, R., Scheffel, J., O'Dey, D. M., Weis, J., Joosten, E. A., Fuhrmann, T., Brook, G. A., et Pallua, N. (2008). CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 173(1), 91-98
- Bradley, J. D. (2004). Systemic Analgesics. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 243-249). New York: Oxford University Press.
- Bradley, J. D., Katz, B. P., et Brandt, K. D. (2001). Severity of knee pain does not predict a better response to an antiinflammatory dose of ibuprofen than to analgesic therapy in patients with osteoarthritis. *Journal of Rheumatology*, 28(5), 1073-1076
- Brandt, K. D. (2002). Animal models of osteoarthritis. *Biorheology*, 39(1-2), 221-235
- Brandt, K. D., et Bradley, J. D. (2004). Topical capsaicin cream. Dans M. D. Kenneth D. Brandt, L. Stefan Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 273-276). Oxford: Oxford University Press.
- Brandt, K. D., Braunstein, E. M., Visco, D. M., O'Connor, B., Heck, D., et Albrecht, M. (1991). Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol*, 18(3), 436-446
- Brouet, I., et Ohshima, H. (1995). Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206(2), 533-540

- Buckwalter, J. A., et Martin, J. A. (2006). Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(2), 150-167
- Burr, D. B. (2003). Subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. Mechanical Aspects. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 125-132). New York: Oxford University Press.
- Butler-Jones, D. (2009). Rapport sur l'état de la santé publique au Canada, Grandir sainement-Priorités pour un avenir en santé. Agence de la Santé Publique du Canada. Ottawa.<http://santepublique.gc.ca/rapportdeACSP>
- Calza, L., Forrest, D., Vennstrom, B., et Hokfelt, T. (2000). Expression of peptides and other neurochemical markers in hypothalamus and olfactory bulb of mice devoid of all known thyroid hormone receptors. *Neuroscience*, 101(4), 1001-1012
- Canas, B., Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Camafeita, E., et Calvo, E. (2006). Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 4(4), 295-320
- Caterina, M. J., et Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 487-517
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., et Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398(6726), 436-441
- Caudle, R. M., Chavkin, C., et Dubner, R. (1994). Kappa 2 opioid receptors inhibit NMDA receptor-mediated synaptic currents in guinea pig CA3 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 14(9), 5580-5589
- Chahl, L. A., et Chahl, J. S. (1986). Plasma extravasation induced by dynorphin-(1-13) in rat skin. *European Journal of Pharmacology*, 124(3), 343-347

- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., et Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21(6), 501-506
- Chambers, H. G., et Sutherland, D. H. (2002). A practical guide to gait analysis. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 10(3), 222-231
- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., et Remmal, A. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis*, 8(3), 217-226
- Charteris, J., Leach, D., et Taves, C. (1979). Comparative kinematic analysis of bipedal and quadrupedal locomotion: a cyclographic technique. *Journal of Anatomy*, 128(Pt 4), 803-819
- Chauvin, M., et Beaulieu, P. (2005). Pharmacologie des opioïdes. Dans P. Beaulieu (dir.), *Pharmacologie de la douleur* (p. 39-77). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.
- Che, F. Y., et Fricker, L. D. (2002). Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(13), 3190-3198
- Chen, F., Shi, Z., Neoh, K. G., et Kang, E. T. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(1), 30-39
- Cho, J. S., Kim, T. H., Lim, J. M., et Song, J. H. (2008). Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 1243, 53-62

- Chung, G., Rhee, J. N., Jung, S. J., Kim, J. S., et Oh, S. B. (2008). Modulation of CaV2.3 calcium channel currents by eugenol. *Journal of Dental Research*, 87(2), 137-141
- Cisar, P., Jany, R., Waczulikova, I., Sumegova, K., Muchova, J., Vojtassak, J., Durackova, Z., Lisy, M., et Rohdewald, P. (2008). Effect of pine bark extract (Pycnogenol) on symptoms of knee osteoarthritis. *Phytotherapy Research*, 22(8), 1087-1092
- Combe, R., Bramwell, S., et Field, M. J. (2004). The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neuroscience Letters*, 370(2-3), 236-240
- Cooper, S. A. (1981). Comparative analgesic efficacies of aspirin and acetaminophen. *Archives of Internal Medicine*, 141(3 Spec No), 282-285
- Cormack, D. H. (1993). *Essential Histology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company.
- Coulthard, P., Simjee, S. U., et Pleuvry, B. J. (2003). Gait analysis as a correlate of pain induced by carrageenan intraplantar injection. *Journal of Neuroscience Methods*, 128(1-2), 95-102
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J. C., et Le Bars, D. (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72(5), 359-371
- Couto, P. A., Filipe, V. M., Magalhaes, L. G., Pereira, J. E., Costa, L. M., Melo-Pinto, P., Bulas-Cruz, J., Mauricio, A. C., Geuna, S., et Varejao, A. S. (2008). A comparison of two-dimensional and three-dimensional techniques for the determination of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 173(2), 193-200
- Cravatt, B. F., Simon, G. M., et Yates, J. R., 3rd. (2007). The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, 450(7172), 991-1000

- Cruwys, S. C., Garrett, N. E., et Kidd, B. L. (1995). Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. *Neuroscience Letters*, 193(3), 205-207
- Das-Gupta, E. P., Lyons, T. J., Hoyland, J. A., Lawton, D. M., et Freemont, A. J. (1993). New histological observations in spontaneously developing osteoarthritis in the STR/ORT mouse questioning its acceptability as a model of human osteoarthritis. *International Journal of Experimental Pathology*, 74(6), 627-634
- De Koninck, Y. (2009). Signaling Events and Ionic Mechanisms Disrupting Spinal Inhibition in Neuropathic Pain. Dans J. Castro-Lopes (dir.), *Current Topics in Pain: 12th World Congress on Pain* (p. 139-164). Seattle: IASP Press.
- Deal, C. L., Schnitzer, T. J., Lipstein, E., Seibold, J. R., Stevens, R. M., Levy, M. D., Albert, D., et Renold, F. (1991). Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. *Clinical Therapeutics*, 13(3), 383-395
- Decaris, E., Guingamp, C., Chat, M., Philippe, L., Grillasca, J. P., Abid, A., Minn, A., Gillet, P., Netter, P., et Terlain, B. (1999). Evidence for neurogenic transmission inducing degenerative cartilage damage distant from local inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, 42(9), 1951-1960
- DeLeo, J. A., et Colburn, R. W. (1999). Proinflammatory cytokines and glial cells: Their role in neuropathic pain. Dans L. R. Watkins & S. F. Maier (dir.), *Cytokines and Pain* (p. 159-181). Basel: Birkhäuser Verlag.
- Delgado, A. V., McManus, A. T., et Chambers, J. P. (2003). Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*, 37(6), 355-361
- Dellmann, H. D., et Eurell, J. (1998). *Textbook of Veterinary Histology*. (5^e éd.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

- Deumens, R., Jaken, R. J., Marcus, M. A., et Joosten, E. A. (2007). The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods*, *164*(1), 120-130
- Dewhirst, F. E. (1980). Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins*, *20*(2), 209-222
- Dickenson, A. H. (2004). Balancing Excitations and Inhibitions in Spinal Circuits. Dans L. Villanueva, A. H. Dickenson & H. Ollat (dir.), *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians, Progress in Pain Research and Management* (Vol. 31, p. 79-105). Seattle: IASP Press.
- Dieppe, P. (1999). Subchondral bone should be the main target for the treatment of pain and disease progression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, *7*(3), 325-326
- Dieppe, P. A., et Lohmander, L. S. (2005). Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*, *365*(9463), 965-973
- Donaldson, L. F., McQueen, D. S., et Seckl, J. R. (1995). Neuropeptide gene expression and capsaicin-sensitive primary afferents: maintenance and spread of adjuvant arthritis in the rat. *J Physiol*, *486* (Pt 2), 473-482
- Dubner, R., et Ruda, M. A. (1992). Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends in Neurosciences*, *15*(3), 96-103
- Ebersberger, A., Charbel Issa, P., Vanegas, H., et Schaible, H. G. (2000). Differential effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide 8-37 upon responses to N-methyl-D-aspartate or (R, S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate in spinal nociceptive neurons with knee joint input in the rat. *Neuroscience*, *99*(1), 171-178

- Ebersberger, A., Grubb, B. D., Willingale, H. L., Gardiner, N. J., Nebe, J., et Schaible, H. G. (1999). The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience*, 93(2), 775-781
- Eisen, J. S., Koren, G., Juurlink, D. N., et Ng, V. L. (2004). N-acetylcysteine for the treatment of clove oil-induced fulminant hepatic failure. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 42(1), 89-92
- El-Shazly, A. E., Masuyama, K., Eura, M., et Ishikawa, T. (1996). Immunoregulatory effect of substance P in human eosinophil migratory function. *Immunological Investigations*, 25(3), 191-201
- Elfvin, L. G., Holmberg, K., Johansson, J., et Aldskogius, H. (1998). The innervation of the synovium of the knee joint in the guinea pig: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Anatomy and Embryology*, 197(4), 293-303
- Engler, A., Aeschlimann, A., Simmen, B. R., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S., et Sprott, H. (2007). Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(4), 884-888
- Farid, R., Rezaieyazdi, Z., Mirfeizi, Z., Hatef, M. R., Mirheidari, M., Mansouri, H., Esmaili, H., Bentley, G., Lu, Y., Foo, Y., et Watson, R. R. (2010). Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. *Nutr Res*, 30(9), 601-606
- Fawcett, D. W., et Jensch, R. P. (2002). *Concise Histology*. (2^e éd.). New York: Oxford University Press

- Felson, D. T. (2003). Epidemiology of Osteoarthritis. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 511). New York: Oxford University Press Inc.
- Felson, D. T. (2005). The sources of pain in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 17(5), 624-628
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., et Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71
- Ferland, C. E., Laverty, S., Beaudry, F., et Vachon, P. (2011). Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 97(3), 603-610
- Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J., et Pelletier, J. P. (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 39(1-2), 237-246
- Fernihough, J., Gentry, C., Bevan, S., et Winter, J. (2005). Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neuroscience Letters*, 388(2), 75-80
- Fernihough, J., Gentry, C., Malcangio, M., Fox, A., Rediske, J., Pellas, T., Kidd, B., Bevan, S., et Winter, J. (2004). Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*, 112(1-2), 83-93
- Ferreira-Gomes, J., Adaes, S., et Castro-Lopes, J. M. (2008). Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *J Pain*, 9(10), 945-954

- Ferreira-Gomes, J., Adaes, S., Sarkander, J., et Castro-Lopes, J. M. (2010). Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis and Rheumatism*, 62(12), 3677-3685
- Fichna, J., Janecka, A., Costentin, J., et Do Rego, J. C. (2007). The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacological Reviews*, 59(1), 88-123
- Fischer, I. U., von Unruh, G. E., et Dengler, H. J. (1990). The metabolism of eugenol in man. *Xenobiotica*, 20(2), 209-222
- Fisher, N. M., Pendergast, D. R., Gresham, G. E., et Calkins, E. (1991). Muscle rehabilitation: its effect on muscular and functional performance of patients with knee osteoarthritis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 72(6), 367-374
- Fitzgerald, M. (1983). Capsaicin and sensory neurones--a review. *Pain*, 15(2), 109-130
- Fletcher, D. (2005). Pharmacologie des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Dans P. Beaulieu (dir.), *Pharmacologie de la douleur* (p. 79-107). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.
- Flores, R. H., et Hochberg, M. C. (2003). Definition and classification of osteoarthritis. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 1-8). New York: Oxford University Press.
- Gabriel, A. F., Marcus, M. A., Honig, W. M., Walenkamp, G. H., et Joosten, E. A. (2007). The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods*, 163(1), 9-16
- Gabriel, A. F., Marcus, M. A., Walenkamp, G. H., et Joosten, E. A. (2009). The CatWalk method: assessment of mechanical allodynia in experimental chronic pain. *Behavioural Brain Research*, 198(2), 477-480

- Gardell, L. R., Wang, R., Burgess, S. E., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Malan, T. P., Jr., Lai, J., et Porreca, F. (2002). Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6747-6755
- Garibaldi, J. A., Greenlaw, J., Choi, J., et Fotovatjah, M. (1995). Treatment of post-operative pain. *Journal of the California Dental Association*, 23(4), 71-72, 74
- Gerwin, N., Bendele, A. M., Glasson, S., et Carlson, C. S. (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18 Suppl 3, S24-34
- Gibson, J. N., White, M. D., Chapman, V. M., et Strachan, R. K. (1992). Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 74(4), 534-537
- Goldring, M. B., et Goldring, S. R. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol*, 213(3), 626-634
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L. I., Hunkapiller, M., et Hood, L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(12), 6666-6670
- Griffiths, W. J., et Wang, Y. (2009). Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem Soc Rev*, 38(7), 1882-1896
- Grimm, T., Schafer, A., et Hogger, P. (2004). Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radical Biology and Medicine*, 36(6), 811-822
- Gronblad, M., Konttinen, Y. T., Korkala, O., Liesi, P., Hukkanen, M., et Polak, J. M. (1988). Neuropeptides in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Journal of Rheumatology*, 15(12), 1807-1810

- Grzanna, R., Lindmark, L., et Frondoza, C. G. (2005). Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food*, 8(2), 125-132
- Guay, M., et Chapleau, C. (1991). *Anatomie fonctionnelle de l'appareil locomoteur; Os, muscles, articulations.*
- Guenette, S. A., Beaudry, F., Marier, J. F., et Vachon, P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J Vet Pharmacol Ther*, 29(4), 265-270
- Guenette, S. A., Helie, P., Beaudry, F., et Vachon, P. (2007a). Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg*, 34(3), 164-170
- Guenette, S. A., Ross, A., Marier, J. F., Beaudry, F., et Vachon, P. (2007b). Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *Eur J Pharmacol*, 562(1-2), 60-67
- Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P., et Gillet, P. (1997). Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis and Rheumatism*, 40(9), 1670-1679
- Guzman, R. E., Evans, M. G., Bove, S., Morenko, B., et Kilgore, K. (2003). Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicologic Pathology*, 31(6), 619-624
- Halquist, M. S., et Thomas Karnes, H. (2011). Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids. *Biomedical Chromatography*, 25(1-2), 47-58

- Hamers, F. P., Koopmans, G. C., et Joosten, E. A. (2006). CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 23(3-4), 537-548
- Handy, R. L. C. (1999). Nitric oxide and inflammatory pain. Dans S. D. Brain & P. K. Moore (dir.), *Pain and Neurogenic Inflammation* (p. 81-102). Basel: Birkhäuser Verlag.
- Harvey, V. L., et Dickenson, A. H. (2009). Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain*, 5, 18
- Hauser, K. F., Foldes, J. K., et Turbek, C. S. (1999). Dynorphin A (1-13) neurotoxicity in vitro: opioid and non-opioid mechanisms in mouse spinal cord neurons. *Experimental Neurology*, 160(2), 361-375
- Hayami, T., Pickarski, M., Wesolowski, G. A., McLane, J., Bone, A., Destefano, J., Rodan, G. A., et Duong le, T. (2004). The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*, 50(4), 1193-1206
- Hayami, T., Pickarski, M., Zhuo, Y., Wesolowski, G. A., Rodan, G. A., et Duong le, T. (2006). Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*, 38(2), 234-243
- He, M., Du, M., Fan, M., et Bian, Z. (2007). In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, 163(3), 137-143
- Hedrich, H. J. (2000). History, Strains and Models. Dans G. J. Krinke & N. AG (dir.), *The Laboratory Rat*. London: Academic Press.

- Heinegard, D., Bayliss, M., et Lorenzo, P. (2003). Biochemistry and metabolism of normal and osteoarthritic cartilage. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (p. 73-82). New York: Oxford University Press.
- Hellio Le Graverand-Gastineau, M. P. (2009). OA clinical trials: current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(11), 1393-1401
- Henrotin, Y., Clutterbuck, A. L., Allaway, D., Lodwig, E. M., Harris, P., Mathy-Hartert, M., Shakibaei, M., et Mobasheri, A. (2010). Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(2), 141-149
- Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H. G., Brauer, R., et Segond von Banchet, G. (2007). The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 36(3), 381-391
- Heppelmann, B., Messlinger, K., et Schmidt, R. F. (1988). Morphological characteristics of the innervation of the cat's knee joint. *Agents and Actions*, 25(3-4), 225-227
- Herbert, M. K., et Holzer, P. (1994). Interleukin-1 beta enhances capsaicin-induced neurogenic vasodilatation in the rat skin. *British Journal of Pharmacology*, 111(3), 681-686
- Herzog, W., Bourne, D., et Youssef, A. R. (2009). Joint Mechanics in Osteoarthritis. Dans D. T. Felson & H. G. Schaible (dir.), *Pain in Osteoarthritis* (p. 133-156). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Hewitt, D. J. (2000). The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. *Clinical Journal of Pain*, 16(2 Suppl), S73-79

- Hildebrand, C., Oqvist, G., Brax, L., et Tuisku, F. (1991). Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec*, 229(4), 545-555
- Holla, J. F., Steultjens, M. P., van der Leeden, M., Roorda, L. D., Bierma-Zeinstra, S. M., den Broeder, A. A., et Dekker, J. (2011). Determinants of range of joint motion in patients with early symptomatic osteoarthritis of the hip and/or knee: an exploratory study in the CHECK cohort. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(4), 411-419
- Honore, P., Wismer, C. T., Mikusa, J., Zhu, C. Z., Zhong, C., Gauvin, D. M., Gomtsyan, A., El Kouhen, R., Lee, C. H., Marsh, K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R., et Jarvis, M. F. (2005). A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(1), 410-421
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., et Hwang, S. R. (2008). Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 393-423
- Huebner, J. L., et Kraus, V. B. (2006). Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea pig. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9), 923-930
- Hulejova, H., Baresova, V., Klezl, Z., Polanska, M., Adam, M., et Senolt, L. (2007). Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*, 38(3), 151-156
- Hurwitz, D. E., Ryals, A. B., Case, J. P., Block, J. A., et Andriacchi, T. P. (2002). The knee adduction moment during gait in subjects with knee osteoarthritis is more closely correlated with static alignment than radiographic disease severity, toe out angle and pain. *Journal of Orthopaedic Research*, 20(1), 101-107

- Im, H. J., Kim, J. S., Li, X., Kotwal, N., Sumner, D. R., van Wijnen, A. J., Davis, F. J., Yan, D., Levine, B., Henry, J. L., Desevre, J., et Kroin, J. S. (2010). Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis and Rheumatism*, 62(10), 2995-3005
- Ishijima, M., Watari, T., Naito, K., Kaneko, H., Futami, I., Yoshimura-Ishida, K., Tomonaga, A., Yamaguchi, H., Yamamoto, T., Nagaoka, I., Kurosawa, H., Poole, A. R., et Kaneko, K. (2011). Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 13(1), R22
- Ivanavicius, S. P., Ball, A. D., Heapy, C. G., Westwood, F. R., Murray, F., et Read, S. J. (2007). Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain*, 128(3), 272-282
- Jadhav, B. K., Khandelwal, K. R., Ketkar, A. R., et Pisal, S. S. (2004). Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30(2), 195-203
- Janusz, M. J., Hookfin, E. B., Heitmeyer, S. A., Woessner, J. F., Freemont, A. J., Hoyland, J. A., Brown, K. K., Hsieh, L. C., Almstead, N. G., De, B., Natchus, M. G., Pikul, S., et Taiwo, Y. O. (2001). Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9(8), 751-760
- Jean, Y. H., Wen, Z. H., Chang, Y. C., Hsieh, S. P., Tang, C. C., Wang, Y. H., et Wong, C. S. (2007). Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(6), 638-645

- Kajander, K. C., Sahara, Y., Iadarola, M. J., et Bennett, G. J. (1990). Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides*, *11*(4), 719-728
- Kalbhen, D. A. (1987). Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol*, *14 Spec No*, 130-131
- Kanai, Y., Nakazato, E., Fujiuchi, A., Hara, T., et Imai, A. (2005). Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*, *49*(7), 977-984
- Kandel, E. R., et Siegelbaum, S. A. (2000a). Overview of Synaptic Transmission. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (4^e éd., p. 175-186). USA: McGraw-Hill.
- Kandel, E. R., et Siegelbaum, S. A. (2000b). Synaptic Integration. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principle of Neural Science* (4^e éd., p. 207-228). USA: McGraw-Hill.
- Kapitzke, D., Vetter, I., et Cabot, P. J. (2005). Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Ther Clin Risk Manag*, *1*(4), 279-297
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., et Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, *7*(1), 33-42
- Karahan, S., Kincaid, S. A., Kammermann, J. R., et Wright, J. C. (2001). Evaluation of the rat stifle joint after transection of the cranial cruciate ligament and partial medial meniscectomy. *Comp Med*, *51*(6), 504-512

- Kaufman, K. R., Hughes, C., Morrey, B. F., Morrey, M., et An, K. N. (2001). Gait characteristics of patients with knee osteoarthritis. *Journal of Biomechanics*, 34(7), 907-915
- Keeble, J. E., et Brain, S. D. (2004). A role for substance P in arthritis? *Neuroscience Letters*, 361(1-3), 176-179
- Kelly, S., Dunham, J. P., et Donaldson, L. F. (2007). Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. *European Journal of Neuroscience*, 26(4), 935-942
- Kidd, B. L. (2006). Osteoarthritis and joint pain. *Pain*, 123(1-2), 6-9
- Kidd, B. L., Mapp, P. I., Blake, D. R., Gibson, S. J., et Polak, J. M. (1990). Neurogenic influences in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 49(8), 649-652
- Kim, S. S., Oh, O. J., Min, H. Y., Park, E. J., Kim, Y., Park, H. J., Nam Han, Y., et Lee, S. K. (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sciences*, 73(3), 337-348
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., et Osborne, B. A. (2007). *Kuby Immunology*. (6^e éd.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Ko, M. C. H., Willmont, K. J., Burritt, A., Hruba, V. J., et Woods, J. H. (2000). Local inhibitory effects of dynorphin A-(1-17) on capsaicin-induced thermal allodynia in rhesus monkeys. *European Journal of Pharmacology*, 402, 69-76
- Koester, J., et Siegelbaum, S. A. (2000). Propagated Signaling: The Action Potential. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (4^e éd., p. 150-170). USA: McGraw-Hill.
- Kontinen, Y. T., Gronblad, M., Hukkanen, M., Kinnunen, E., Santavirta, S., Polak, J. M., Gibson, S., Zhao, Y., Mapp, P., Revell, P., et et al. (1989). Pain fibers in

osteoarthritis: a review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 18(4 Suppl 2), 35-40

Kow, L. M., et Pfaff, D. W. (1988). Neuromodulatory actions of peptides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 28, 163-188

Krieger, D. T. (1983). Brain peptides: what, where, and why? *Science*, 222(4627), 975-985

Krinke, G. J., Bulluck, G. R., et Bunton, T. (2000). *The Laboratory Rat*. San Diego: Academic Press Inc.

Laadhar, L., Zitouni, M., Kalle-Sellami, M., Mahjoub, M., Sellami, S., et Makni, S. (2007). [Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms]. *Rev Med Interne*, 28(8), 531-536

Laekeman, G. M., Hoof, V. L., Haemers, A., Berghe, V. A. D., Herman, A. G., et Vlietink, A. K. (1990). Eugenol, a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. *Phytotherapy Research*, 4, 90-96

Lai, J., Luo, M. C., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L. R., Ossipov, M. H., et Porreca, F. (2006). Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1534-1540

Lai, J., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Malan, T. P., Jr., et Porreca, F. (2001). Neuropathic pain: the paradox of dynorphin. *Molecular Interventions*, 1(3), 160-167

Lampert, A., O'Reilly, A. O., Reeh, P., et Leffler, A. (2010). Sodium channelopathies and pain. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*, 460(2), 249-263

Laughlin, T. M., Larson, A. A., et Wilcox, G. L. (2001). Mechanisms of induction of persistent nociception by dynorphin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(1), 6-11

- Laupacis, A., Bookman, A., Brophy, J., Cairns, J., Majumdar, S. R., Montie, P., Rahme, E., Roberts, R. S., Rosser, W., Rostom, A., Tugwell, P., Wilhelm, L., et Zummer, M. (2005). Rapport du Groupe Consultatif d'experts sur l'innocuité des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sélectifs de la COX-2. Santé Canada. [www.sc-hc.gc.ca.12.http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/sap_report_gcs_rapport_cox2-fra.pdf](http://www.sc-hc.gc.ca/12.http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/sap_report_gcs_rapport_cox2-fra.pdf)
- Lavery, S., Girard, C. A., Williams, J. M., Hunziker, E. B., et Pritzker, K. P. (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18 Suppl 3, S53-65
- Lee, M. H., Yeon, K. Y., Park, C. K., Li, H. Y., Fang, Z., Kim, M. S., Choi, S. Y., Lee, S. J., Lee, S., Park, K., Lee, J. H., Kim, J. S., et Oh, S. B. (2005). Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res*, 84(9), 848-851
- Lee, Y. Y., Hung, S. L., Pai, S. F., Lee, Y. H., et Yang, S. F. (2007). Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators in human macrophages. *J Endod*, 33(6), 698-702
- Levy, R. M., Saikovsky, R., Shmidt, E., Khokhlov, A., et Burnett, B. P. (2009). Flavocoxid is as effective as naproxen for managing the signs and symptoms of osteoarthritis of the knee in humans: a short-term randomized, double-blind pilot study. *Nutr Res*, 29(5), 298-304
- Li, H. Y., Lee, B. K., Kim, J. S., Jung, S. J., et Oh, S. B. (2008). Eugenol Inhibits ATP-induced P2X Currents in Trigeminal Ganglion Neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*, 12(6), 315-321
- Li, H. Y., Park, C. K., Jung, S. J., Choi, S. Y., Lee, S. J., Park, K., Kim, J. S., et Oh, S. B. (2007). Eugenol inhibits K⁺ currents in trigeminal ganglion neurons. *Journal of Dental Research*, 86(9), 898-902

- Li, J., Simone, D. A., et Larson, A. A. (1999). Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain*, 79(1), 75-82
- Lionnet, L., Beaudry, F., et Vachon, P. (2010). Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytotherapy Research*, 24(11), 1645-1653
- Lipsky, P. E., Abramson, S. B., Breedveld, F. C., Brook, P., Burmester, R., Buttgerit, F., Cannon, G. W., Catella-Lawson, F., Crofford, L. J., Doherty, M., Dougados, M., DuBois, R. N., Froelich, J., Garcia Rodriguez, L. A., Gibofsky, A., Hernandez-Diaz, S., Hochberg, M. C., Krause, A., Liang, M. H., Machold, K., Peloso, P. M., Raisz, L. G., Schayes, B., Scheiman, J. M., Simon, L. S., et Smolen, J. (2000). Analysis of the effect of COX-2 specific inhibitors and recommendations for their use in clinical practice. *Journal of Rheumatology*, 27(6), 1338-1340
- Littlewood, N. K., Todd, A. J., Spike, R. C., Watt, C., et Shehab, S. A. (1995). The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience*, 66(3), 597-608
- Livesley, P. J., Doherty, M., Needoff, M., et Moulton, A. (1991). Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 73(6), 922-926
- Lotz, M., Vaughan, J. H., et Carson, D. A. (1988). Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 241(4870), 1218-1221
- Lozada, C. J., et Altman, R. D. (2005). Management of Osteoarthritis. Dans W. J. Koopman & L. W. Moreland (dir.), *Arthritis and Allied Conditions; A Textbook of Rheumatology* (15^e éd., Vol. 2, p. 2257-2276). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

- Ma, W., et Quirion, R. (2006). Increased calcitonin gene-related peptide in neuroma and invading macrophages is involved in the up-regulation of interleukin-6 and thermal hyperalgesia in a rat model of mononeuropathy. *Journal of Neurochemistry*, 98(1), 180-192
- Ma, W., et Quirion, R. (2007). Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*, 11(3), 307-320
- MacKay-Lyons, M. (2002). Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence. *Physical Therapy*, 82(1), 69-83
- Malan, T. P., Ossipov, M. H., Gardell, L. R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai, J., et Porreca, F. (2000). Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain*, 86(1-2), 185-194
- Maly, M. R., Costigan, P. A., et Olney, S. J. (2008). Mechanical factors relate to pain in knee osteoarthritis. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 23(6), 796-805
- Manz, A., Pamme, N., et Iossifidis, D. (2004). *Bioanalytical Chemistry*. London: Imperial College Press.
- Mao, J. (1999). NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 30(3), 289-304
- Marchand, S. (2005). Neurophysiologie de la douleur. Dans P. Beaulieu (dir.), *Pharmacologie de la douleur* (p. 3-37). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.
- Marcus, D. M., et Suarez-Almazor, M. E. (2001). Is there a role for ginger in the treatment of osteoarthritis? *Arthritis and Rheumatism*, 44(11), 2461-2462

- Marieb, E. N. (1998). *Human Anatomy and Physiology* (4^e éd.). The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Marier, J. F., Chen, K., Prince, P., Scott, G., del Castillo, J. R., et Vachon, P. (2005). Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69(2), 151-154
- Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M., et Kim, S. (1992). Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 73(6), 729-737
- Marvizon, J. C., Chen, W., et Murphy, N. (2009). Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *Journal of Comparative Neurology*, 517(1), 51-68
- Massardier, D., et Hunt, P. F. (1989). A direct non-opiate interaction of dynorphin-(1-13) with the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *European Journal of Pharmacology*, 170(1-2), 125-126
- McCleskey, E. W. (2003). Neurobiology: new player in pain. *Nature*, 424(6950), 729-730
- McDougall, J. J. (2006a). Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Research and Therapy*, 8(6), 220
- McDougall, J. J. (2006b). Pain and OA. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 6(4), 385-386
- McGillis, J. P., et Fernandez, S. (1999). Sensory neuropeptides, neurogenic inflammation and inflammatory cells. Dans S. D. Brain & P. K. Moore (dir.), *Pain and Neurogenic Inflammation* (p. 115-135). Basel: Birkhäuser Verlag.

- McQueen, D. S. (1999). Inflammatory pain and the joint. Dans S. D. Brain & P. K. Moore (dir.), *Pain and Neurogenic Inflammation* (p. 137-166). Basel: Birkhäuser Verlag.
- Medvedeva, Y. V., Kim, M. S., et Usachev, Y. M. (2008). Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5295-5311
- Mele, E. (2007). Epidemiology of Osteoarthritis. *Veterinary Focus*, 17(3), 4-10
- Merg, F., Filliol, D., Usynin, I., Bazov, I., Bark, N., Hurd, Y. L., Yakovleva, T., Kieffer, B. L., et Bakalkin, G. (2006). Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor. *Journal of Neurochemistry*, 97(1), 292-301
- Merskey, H., et Bogduk, N. (1994). *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*. Seattle: IASP Press.
- Miller, R., Toneff, T., Vishnuvardhan, D., Beinfeld, M., et Hook, V. Y. (2003). Selective roles for the PC2 processing enzyme in the regulation of peptide neurotransmitter levels in brain and peripheral neuroendocrine tissues of PC2 deficient mice. *Neuropeptides*, 37(3), 140-148
- Mine, T., Kimura, M., Sakka, A., et Kawai, S. (2000). Innervation of nociceptors in the menisci of the knee joint: an immunohistochemical study. *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery*, 120(3-4), 201-204
- Minns, R. J. (2005). The role of gait analysis in the management of the knee. *Knee*, 12(3), 157-162
- Minor, M. A. (2004). Physical therapy. Dans K. D. Brandt, M. Lohmander, L.S. (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 299-305). Oxford: Oxford University Press.
- Mizutani, T., Satoh, K., Nomura, H., et Nakanishi, K. (1991). Hepatotoxicity of eugenol in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine.

Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 71(2), 219-230

- Moalem, G., Xu, K., et Yu, L. (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*, 129(3), 767-777
- Moyer, S. C., Budnik, B. A., Pittman, J. L., Costello, C. E., et O'Connor, P. B. (2003). Attomole peptide analysis by high-pressure matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(23), 6449-6454
- Myers, S. L., Brandt, K. D., Ehlich, J. W., Braunstein, E. M., Shelbourne, K. D., Heck, D. A., et Kalasinski, L. A. (1990). Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *Journal of Rheumatology*, 17(12), 1662-1669
- Nakagawa, N., Sano, H., et Iwamoto, I. (1995). Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration. *Peptides*, 16(4), 721-725
- Navez, M., Laurent, B., et Nayme, P. (1997). Bases physiologiques de la douleur. *J. Réadapt. Méd.*, 17(3), 86-92
- Neogi, T., et Scholz, J. (2009). Neurobiological Mechanisms of Osteoarthritis Pain and Analgesic Treatment. Dans D. T. Felson & H. G. Schaible (dir.), *Pain in Osteoarthritis* (p. 233-254). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Neto, F. L., Ferreira-Gomes, J., et Castro-Lopes, J. M. (2006). Distribution of GABA receptors in the thalamus and their involvement in nociception. *Adv Pharmacol*, 54, 29-51
- Neugebauer, V., Han, J. S., Adwanikar, H., Fu, Y., et Ji, G. (2007). Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain*, 3, 8

- Neugebauer, V., Rumenapp, P., et Schaible, H. G. (1996). Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation. *Neuroscience*, 71(4), 1095-1109
- Nielsen, R. H., Stoop, R., Leeming, D. J., Stolina, M., Qvist, P., Christiansen, C., et Karsdal, M. A. (2008). Evaluation of cartilage damage by measuring collagen degradation products in joint extracts in a traumatic model of osteoarthritis. *Biomarkers*, 13(1), 79-87
- Niissalo, S., Hukkanen, M., Imai, S., Tornwall, J., et Kontinen, Y. T. (2002). Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, 384-399
- Nishijima, H., Uchida, R., Kawakami, N., Shimamura, K., et Kitamura, K. (1998). Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *Journal of Smooth Muscle Research*, 34(3), 123-137
- O'Reilly, S., et Doherty, M. (2003). Signs, Symptoms and Laboratory Tests. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 511). New York: Oxford University Press.
- Obreja, O., Schmelz, M., Poole, S., et Kress, M. (2002). Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo. *Pain*, 96(1-2), 57-62
- Ohkubo, T., et Shibata, M. (1997). The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of Dental Research*, 76(4), 848-851

- Oku, R., Satoh, M., Fujii, N., Otaka, A., Yajima, H., et Takagi, H. (1987). Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Research*, 403(2), 350-354
- Park, C. K., Li, H. Y., Yeon, K. Y., Jung, S. J., Choi, S. Y., Lee, S. J., Lee, S., Park, K., Kim, J. S., et Oh, S. B. (2006). Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. *Journal of Dental Research*, 85(10), 900-904
- Park, S. H., Sim, Y. B., Lee, J. K., Kim, S. M., Kang, Y. J., Jung, J. S., et Suh, H. W. (2011). The analgesic effects and mechanisms of orally administered eugenol. *Archives of Pharmacal Research*, 34(3), 501-507
- Parra, M. C., Nguyen, T. N., Hurley, R. W., et Hammond, D. L. (2002). Persistent inflammatory nociception increases levels of dynorphin 1-17 in the spinal cord, but not in supraspinal nuclei involved in pain modulation. *J Pain*, 3(4), 330-336
- Payan, D. G., et Goetzl, E. J. (1985). Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *Journal of Immunology*, 135(2 Suppl), 783s-786s
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., et Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), 233-252
- Perone, M. J., et Castro, M. G. (1997). Prohormone and proneuropeptide synthesis and secretion. *Histology and Histopathology*, 12(4), 1179-1188
- Pincus, T., Koch, G. G., Sokka, T., Lefkowitz, J., Wolfe, F., Jordan, J. M., Luta, G., Callahan, L. F., Wang, X., Schwartz, T., Abramson, S. B., Caldwell, J. R., Harrell, R. A., Kremer, J. M., Lautzenheiser, R. L., Markenson, J. A., Schnitzer, T. J., Weaver, A., Cummins, P., Wilson, A., Morant, S., et Fort, J. (2001). A randomized, double-blind, crossover clinical trial of diclofenac plus misoprostol versus acetaminophen in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *Arthritis and Rheumatism*, 44(7), 1587-1598

- Pomonis, J. D., Boulet, J. M., Gottshall, S. L., Phillips, S., Sellers, R., Bunton, T., et Walker, K. (2005). Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*, 114(3), 339-346
- Poole, A. R., Guilak, F., et Abramson, S. B. (2007). Etiopathogenesis of Osteoarthritis. Dans R. W. Moskowitz, R. D. Altman, M. C. Hochberg, J. A. Buckwalter & V. M. Goldberg (dir.), *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgery Management* (4^e éd., p. 27-49). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Poole, R., Blake, S., Buschmann, M., Goldring, S., Lavery, S., Lockwood, S., Matyas, J., McDougall, J., Pritzker, K., Rudolphi, K., van den Berg, W., et Yaksh, T. (2010). Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18 Suppl 3, S10-16
- Porreca, F. (2010). Nociceptors, the Spinal Dorsal Horn, and Descending Modulation. Dans J. Mogil (dir.), *Pain 2010- An updated review: refresher course syllabus* (p. 3-12). Seattle: IASP Press.
- Pramod, K., Ansari, S. H., et Ali, J. (2010). Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. *Nat Prod Commun*, 5(12), 1999-2006
- Pritzker, K. P. (1994). Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis*, 53(6), 406-420
- Pritzker, K. P., et Kessler, M. J. (1995). Diseases of the Musculoskeletal System. Dans B. T. Bennett, C. R. Abee & R. Hendrickson (dir.), *Nonhuman Primates in Biomedical Research, Biology and Management* (p. 428). San Diego, CA: Academic Press.
- Pritzker, K. P. H. (2003). Pathology of Osteoarthritis. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 49-58). New York: Oxford University Press.

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., et Williams, S. M. (2001). *Neurosciences*. (2^e éd.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Puttfarcken, P. S., Han, P., Joshi, S. K., Neelands, T. R., Gauvin, D. M., Baker, S. J., Lewis, L. G., Bianchi, B. R., Mikusa, J. P., Koenig, J. R., Perner, R. J., Kort, M. E., Honore, P., Faltynek, C. R., Kym, P. R., et Reilly, R. M. (2010). A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ol], a novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain*, 150(2), 319-326
- Raffa, R. B., Stone, D. J., Jr., et Tallarida, R. J. (2000). Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(1), 291-294
- Raghavenra, H., Diwakar, B. T., Lokesh, B. R., et Naidu, K. A. (2006). Eugenol--the active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74(1), 23-27
- Rains, C., et Bryson, H. M. (1995). Topical capsaicin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis. *Drugs and Aging*, 7(4), 317-328
- Randic, M., Cheng, G., et Kojic, L. (1995). kappa-opioid receptor agonists modulate excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6809-6826
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., et Flower, R. J. (2007). *Rang and Dale's Pharmacology*. (6^e éd.). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.

- Raud, J., Lundeberg, T., Brodda-Jansen, G., Theodorsson, E., et Hedqvist, P. (1991). Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180(3), 1429-1435
- Reddy, A. C., et Lokesh, B. R. (1994). Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 38(6), 349-358
- Ritsner, M. S., et Gottesman, I. I. (2009). Where do we stand in the quest for neuropsychiatric biomarkers and endophenotypes and what next? Dans M. S. Ritsner (dir.), *The Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes* (p. 274). New York: Springer Science+Business Media B.V.
- Roepstorff, P., et Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 11(11), 601
- Roman-Blas, J. A., et Jimenez, S. A. (2006). NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9), 839-848
- Ross, D. R., et Varipapa, R. J. (1989). Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. *New England Journal of Medicine*, 321(7), 474-475
- Ruda, M. A., Iadarola, M. J., Cohen, L. V., et Young, W. S., 3rd. (1988). In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(2), 622-626
- Salo, P. T., et Theriault, E. (1997). Number, distribution and neuropeptide content of rat knee joint afferents. *Journal of Anatomy*, 190 (Pt 4), 515-522

- Salter, M. W. (2005). Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. *Curr Top Med Chem*, 5(6), 557-567
- Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V., et Woolf, C. J. (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410(6827), 471-475
- Sandkuhler, J. (2009). The Role of Inhibition in the Generation and Amplification of Pain. Dans J. Castro-Lopez (dir.), *Current Topics in Pain: 12th World Congress on Pain* (p. 53-71). Seattle: IASP Press.
- Sandur, S. K., Ichikawa, H., Pandey, M. K., Kunnumakkara, A. B., Sung, B., Sethi, G., et Aggarwal, B. B. (2007). Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), 568-580
- Satoh, O., et Omote, K. (1996). Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Research*, 728(1), 27-36
- Saunders, J. B., Inman, V. T., et Eberhart, H. D. (1953). The major determinants in normal and pathological gait. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 35-A(3), 543-558
- Schafer, A., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durackova, Z., et Hogger, P. (2006). Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(1), 5-9
- Schaible, H. G. (2004). Spinal mechanisms contributing to joint pain. *Novartis Found Symp*, 260, 4-22; discussion 22-27, 100-104, 277-109

- Schaible, H. G. (2009). Neuronal Mechanisms of Joint Pain. Dans J. Castro-Lopez (dir.), *Current Topics in Pain: 12th World Congress on Pain* (p. 115-137). Seattle: IASP Press.
- Schaible, H. G., Del Rosso, A., et Matucci-Cerinic, M. (2005). Neurogenic aspects of inflammation. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 31(1), 77-101, ix
- Schaible, H. G., Jarrott, B., Hope, P. J., et Duggan, A. W. (1990). Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Research*, 529(1-2), 214-223
- Schaible, H. G., et Radbruch, L. (2006). [The capsaicin receptor--a milestone in fundamentally oriented pain research]. *Schmerz*, 20(3), 179-180
- Schaible, H. G., et Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 389(4), 237-243
- Schaible, H. G., Richter, F., Ebersberger, A., Boettger, M. K., Vanegas, H., Natura, G., Vazquez, E., et Segond von Banchet, G. (2009). Joint pain. *Experimental Brain Research*, 196(1), 153-162
- Schaible, H. G., Schmelz, M., et Tegeder, I. (2006). Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(2), 323-342
- Schipplein, O. D., et Andriacchi, T. P. (1991). Interaction between active and passive knee stabilizers during level walking. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(1), 113-119
- Schmelz, M., Bennett, G. J., et Peterson, K. L. (2010). Utility and Development of Pain Models: Animals to Humans. Dans J. Mogil (dir.), *Pain 2010: An Updated Review, Refresher Course Syllabus* (p. 87-98). Seattle: IASP Press.

- Schnitzer, T. J., Popovich, J. M., Andersson, G. B., et Andriacchi, T. P. (1993). Effect of piroxicam on gait in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis and Rheumatism*, 36(9), 1207-1213
- Schuelert, N., et McDougall, J. J. (2006). Electrophysiological evidence that the vasoactive intestinal peptide receptor antagonist VIP6-28 reduces nociception in an animal model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(11), 1155-1162
- Schuelert, N., et McDougall, J. J. (2008). Cannabinoid-mediated antinociception is enhanced in rat osteoarthritic knees. *Arthritis and Rheumatism*, 58(1), 145-153. doi:10.1002/art.23156
- Schuelert, N., et McDougall, J. J. (2009). Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neuroscience Letters*, 465(2), 184-188
- Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., Sendzik, J., John, T., et Shakibaei, M. (2004). Effects of curcumin (diferuloylmethane) on nuclear factor kappaB signaling in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030, 578-586
- Setton, L. A., Elliott, D. M., et Mow, V. C. (1999). Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 7(1), 2-14
- Seybold, V. S., Jia, Y. P., et Abrahams, L. G. (2003). Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain*, 105(1-2), 47-55
- Shakibaei, M., John, T., Schulze-Tanzil, G., Lehmann, I., et Mobasheri, A. (2007). Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular

- chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, 73(9), 1434-1445
- Sharif Naeini, R., Cahill, C. M., Ribeiro-da-Silva, A., Menard, H. A., et Henry, J. L. (2005). Remodelling of spinal nociceptive mechanisms in an animal model of monoarthritis. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 2005-2015
- Sharma, J. N., Srivastava, K. C., et Gan, E. K. (1994). Suppressive effects of eugenol and ginger oil on arthritic rats. *Pharmacology*, 49(5), 314-318
- Sharma, L. (2004). The role of proprioceptive deficits, ligamentous laxity, and malalignment in development and progression of knee osteoarthritis. *Journal of Rheumatology. Supplement*, 70, 87-92
- Sharma, L., et Kapoor, D. (2007). Epidemiology of Osteoarthritis. Dans R. W. Moskowitz, R. D. Altman, M. C. Hochberg, J. A. Buckwalter & V. M. Goldberg (dir.), *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management* (4^e éd., p. 3-25). Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins.
- Shen, C. L., Hong, K. J., et Kim, S. W. (2003). Effects of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on decreasing the production of inflammatory mediators in sow osteoarthrotic cartilage explants. *J Med Food*, 6(4), 323-328
- Shenker, N., Haigh, R., Roberts, E., Mapp, P., Harris, N., et Blake, D. (2003). A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology*, 42(11), 1279-1286
- Shukla, V. K., et Lemaire, S. (1994). Non-opioid effects of dynorphins: possible role of the NMDA receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(11), 420-424
- Simjee, S. U., Jawed, H., Quadri, J., et Saeed, S. A. (2007). Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying

antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther*, 9(5), R91

Simjee, S. U., Pleuvry, B. J., et Coulthard, P. (2004). Modulation of the gait deficit in arthritic rats by infusions of muscimol and bicuculline. *Pain*, 109(3), 453-460

Singh, S. (2007). From exotic spice to modern drug? *Cell*, 130(5), 765-768

Sluka, K. A., et Westlund, K. N. (1993). Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain*, 55(3), 367-377

Smith, M. M., et Little, C. B. (2007). Experimental Models of Osteoarthritis. Dans R. W. Moskowitz, R. D. Altman & M. C. Hochberg (dir.), *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical; Surgical Management* (4^e éd., p. 471). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Sreejayan, N., et Rao, M. N. (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittel-Forschung*, 46(2), 169-171

Srimal, R. C., et Dhawan, B. N. (1973). Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25(6), 447-452

Staton, P. C., Wilson, A. W., Bountra, C., Chessell, I. P., et Day, N. C. (2007). Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *European Journal of Pain*, 11(3), 283-289

Stein, C., Comisel, K., Haimerl, E., Yassouridis, A., Lehrberger, K., Herz, A., et Peter, K. (1991). Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *New England Journal of Medicine*, 325(16), 1123-1126

- Stengaard-Pedersen, K., Ekesbo, R., Karvonen, A. L., et Lyster, M. (2004). Celecoxib 200 mg q.d. is efficacious in the management of osteoarthritis of the knee or hip regardless of the time of dosing. *Rheumatology*, 43(5), 592-595
- Strohalm, M. (2011). mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. www.mmass.org.
- Sun, R. Q., Tu, Y. J., Lawand, N. B., Yan, J. Y., Lin, Q., et Willis, W. D. (2004). Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *Journal of Neurophysiology*, 92(5), 2859-2866
- Suter, E., Herzog, W., Leonard, T. R., et Nguyen, H. (1998). One-year changes in hind limb kinematics, ground reaction forces and knee stability in an experimental model of osteoarthritis. *Journal of Biomechanics*, 31(6), 511-517
- Sydbom, A., et Terenius, L. (1985). The histamine-releasing effect of dynorphin and other peptides possessing Arg-Pro sequences. *Agents and Actions*, 16(3-4), 269-272
- Szallasi, A., et Blumberg, P. M. (1996). Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain*, 68(2-3), 195-208
- Tan-No, K., Esashi, A., Nakagawasai, O., Niijima, F., Tadano, T., Sakurada, C., Sakurada, T., Bakalkin, G., Terenius, L., et Kisara, K. (2002). Intrathecally administered big dynorphin, a prodynorphin-derived peptide, produces nociceptive behavior through an N-methyl-D-aspartate receptor mechanism. *Brain Research*, 952(1), 7-14
- Tan-No, K., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Niijima, F., Sato, T., Satoh, S., Sakurada, S., Marinova, Z., Yakovleva, T., Bakalkin, G., Terenius, L., et Tadano, T. (2005). Pronociceptive role of dynorphins in uninjured animals: N-ethylmaleimide-induced nociceptive behavior mediated through inhibition of dynorphin degradation. *Pain*, 113(3), 301-309

- Tang, H. B., Li, Y. S., Miyano, K., et Nakata, Y. (2008). Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology*, 55(8), 1405-1411
- Tang, Q., Lynch, R. M., Porreca, F., et Lai, J. (2000). Dynorphin A elicits an increase in intracellular calcium in cultured neurons via a non-opioid, non-NMDA mechanism. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2610-2615
- Tannenbaum, H., Berenbaum, F., Reginster, J. Y., Zacher, J., Robinson, J., Poor, G., Bliddal, H., Uebelhart, D., Adami, S., Navarro, F., Lee, A., Moore, A., et Gimona, A. (2004). Lumiracoxib is effective in the treatment of osteoarthritis of the knee: a 13 week, randomised, double blind study versus placebo and celecoxib. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(11), 1419-1426
- Therkleson, T. (2010). Ginger compress therapy for adults with osteoarthritis. *Journal of Advanced Nursing*, 66(10), 2225-2233
- Thomas, K. S., Muir, K. R., Doherty, M., Jones, A. C., O'Reilly, S. C., et Bassey, E. J. (2002). Home based exercise programme for knee pain and knee osteoarthritis: randomised controlled trial. *BMJ*, 325(7367), 752
- Thompson, D. C., Constantin-Teodosiu, D., et Moldeus, P. (1991). Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 77(2), 137-147
- Tjolsen, A., Lund, A., et Hole, K. (1991). Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 193(2), 193-201

- Todd, A. J. (2009). Neuronal Circuits and Receptors Involved in Spinal Cord Pain Processing. Dans J. Castro-Lopes (dir.), *Current Topics in Pain: 12th World Congress on Pain* (p. 25-51). Seattle: IASP Press.
- Todd, A. J., et McKenzie, J. (1989). GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 31(3), 799-806
- Todd, A. J., Spike, R. C., et 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
- Torres, L., Dunlop, D. D., Peterfy, C., Guermazi, A., Prasad, P., Hayes, K. W., Song, J., Cahue, S., Chang, A., Marshall, M., et Sharma, L. (2006). The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(10), 1033-1040
- Towheed, T. E., et Hochberg, M. C. (1997). A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the hip. *Journal of Rheumatology*, 24(2), 349-357
- Turk, D. C., et Okifuji, A. (2001). Pain terms and taxonomies. Dans D. Loeser, S. H. Butler, J. J. Chapman & D. C. Turk (dir.), *Bonica's management of pain* (3^e éd., p. 18-25). New York: Lippincott Williams & Wilkins.
- Uhl, G. R., et Nishimori, T. (1990). Neuropeptide gene expression and neural activity: assessing a working hypothesis in nucleus caudalis and dorsal horn neurons expressing preproenkephalin and preprodynorphin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 10(1), 73-98
- Vachon, P., Masse, R., et Gibbs, B. F. (2004). Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68(2), 86-92

- Vanegas, H., et Schaible, H. G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research. Brain Research Reviews*, 46(3), 295-309
- Vilensky, J. A. (2003). Innervation of the joint and its role in osteoarthritis. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^e éd., p. 511). New York: Oxford University Press.
- Vincelette, J., Xu, Y., Zhang, L. N., Schaefer, C. J., Vergona, R., Sullivan, M. E., Hampton, T. G., et Wang, Y. X. (2007). Gait analysis in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 9(6), R123
- Vrinten, D. H., et Hamers, F. F. (2003). 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain*, 102(1-2), 203-209
- Waddell, G. (1987). 1987 Volvo award in clinical sciences. A new clinical model for the treatment of low-back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*, 12(7), 632-644
- Wang, Z., Gardell, L. R., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Brennan, M. B., Hochgeschwender, U., Hruby, V. J., Malan, T. P., Jr., Lai, J., et Porreca, F. (2001). Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, 21(5), 1779-1786
- Werz, M. A., et Macdonald, R. L. (1985). Dynorphin and neendorphin peptides decrease dorsal root ganglion neuron calcium-dependent action potential duration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 234(1), 49-56
- Westaway, S. M. (2007). The potential of transient receptor potential vanilloid type 1 channel modulators for the treatment of pain. *J Med Chem*, 50(11), 2589-2596

- Wie, M. B., Won, M. H., Lee, K. H., Shin, J. H., Lee, J. C., Suh, H. W., Song, D. K., et Kim, Y. H. (1997). Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 225(2), 93-96
- Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J., et Rudolphi, K. A. (2005). Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov*, 4(4), 331-344
- Wisleder, D., Zernicke, R. F., et Smith, J. L. (1990). Speed-related changes in hindlimb intersegmental dynamics during the swing phase of cat locomotion. *Experimental Brain Research*, 79(3), 651-660
- Wong, G. Y., et Gavva, N. R. (2009). Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev*, 60(1), 267-277
- Woolf, A. D., et Pfleger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(9), 646-656
- Woolf, C. J., et Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353-364
- Woolf, C. J., Safieh-Garabedian, B., Ma, Q. P., Crilly, P., et Winter, J. (1994). Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*, 62(2), 327-331
- Yang, B. H., Piao, Z. G., Kim, Y. B., Lee, C. H., Lee, J. K., Park, K., Kim, J. S., et Oh, S. B. (2003). Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res*, 82(10), 781-785
- Yeon, K. Y., Chung, G., Kim, Y. H., Hwang, J. H., Davies, A. J., Park, M. K., Ahn, D. K., Kim, J. S., Jung, S. J., et Oh, S. B. (2011). Eugenol reverses mechanical allodynia

after peripheral nerve injury by inhibiting hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. *Pain*, 152(9), 2108-2116

Yeon, K. Y., Kim, S. A., Kim, Y. H., Lee, M. K., Ahn, D. K., Kim, H. J., Kim, J. S., Jung, S. J., et Oh, S. B. (2010). Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *Journal of Dental Research*, 89(2), 170-174

Zachariou, V., et Goldstein, B. D. (1997). Dynorphin-(1-8) inhibits the release of substance P-like immunoreactivity in the spinal cord of rats following a noxious mechanical stimulus. *European Journal of Pharmacology*, 323(2-3), 159-165

Zhang, L., Hoff, A. O., Wimalawansa, S. J., Cote, G. J., Gagel, R. F., et Westlund, K. N. (2001). Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity. *Pain*, 89(2-3), 265-273

Zubrzycka, M., et Janecka, A. (2000). Substance P: transmitter of nociception (Minireview). *Endocrine Regulations*, 34(4), 195-201

ANNEXE I

Article comme deuxième auteur concernant la méthode d'identification, de caractérisation et de quantification de neuropeptides spécifiques chez le rat

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2011), with permission from John Wiley & Sons. License number : 2661400165905.

Francis Beaudry ^a, Catherine E. Ferland ^a, Pascal Vachon ^a (2009).

Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. Sep; 23(9): 940-50.

^aFaculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Canada

1. Abstract

Substance P and CGRP play a central role in neuropathic pain development and maintenance. Additionally, dynorphin A is an endogenous ligand of opioid receptors implicated into the modulation of neurotransmitters including neuropeptides such as substance P and CGRP. This manuscript proposes a method to characterise, identify and quantify substance P, CGRP and dynorphin A in rat spinal cord by HPLC-ESI/MS/MS. Rat spinal cords were collected and homogenized into a TFA solution. Samples were chromatographed using a microbore C8 10 x 1mm column and a 19 min linear gradient (0:100 → 40:60; ACN:0.2% formic acid in water) at a flow rate of 75 μ L/min for a total run time of 32 min. The peptides were identified in rat spinal cord based on full scan MS/MS spectra. Substance P, CGRP and dynorphin A were predominantly identified by the presence of specific b CID fragments. Extracted ion chromatogram (XIC) suggested selected mass transitions of 674 → [600+254], 952 → [1215+963] and 717 → [944+630] for substance P, CGRP and dynorphin A for isolation and quantitative analysis. A linear regression (weighted 1/x) was used and coefficients of correlations (r) ranging from 0.990 to 0.999 were observed. The precision (%CV) and accuracy (%NOM) observed ranged from 10.9 to 14.4%, 8.9 to 14.2%, 8.8 to 13.0% and 91.0 to 110.2%, 97.2 to 107.3%, 91.8 to 97.3% for substance P, CGRP and dynorphin A respectively. Following the analysis of rat spinal cords, the mean endogenous concentrations were 110.7 pmol/g, 2541 pmol/g and 779.4 pmol/g for substance P, CGRP and dynorphin A respectively. The results obtained show that the method provides adequate figures of merit to support targeted peptidomic studies aimed to determine neuropeptide regulation in animal neuropathic and chronic pain models.

Keywords : electrospray; mass spectrometry; liquid chromatography; neuropeptides; neurochemistry; quantitative analysis; pain.

2. Introduction

Recent LC-MS technological developments followed by the integration of new analytical strategies have significantly contributed to the acceleration of drug discovery and development. Moreover, recent progress in instrumentation and data analysis has provided new tools for future developments. Certainly, the meaning of bioanalysis has evolved and has resulted in the on going development of LC-MS based technologies and strategies. The technological developments were the basis of novel applications that constituted a major growing factor for pharmaceutical and clinical developments [Calvo *et al.*, 2005; Korfmacher, 2005; Guerrero and Kleiner, 2005]. The vast majority of pharmaceutical industry applications seem to mainly emphasize high throughput, sensitivity, and structural analysis. However current trends highlight the emerging importance of structural and mechanistic information especially in regards of biomarkers [Bijlsma *et al.*, 2006; Guerrero and Kleiner, 2005; Bischoff and Luider, 2004]. Recent perspectives on future LC-MS applications in drug development feature the discovery, characterization and quantification of biomarkers to leverage our understanding of the molecular biology of specific pathology. Research on biomarkers is vast and complex. We are particularly interested in the problem of neuropathic and chronic pain with a special emphasis on the mechanism of pain transmission and modulation in order to identify potential drug targets with higher degree of confidence.

The treatment of pain perception following traumatized nervous tissue leading to hyperalgesia and allodynia in neuropathic animals has been investigated with corticosteroids [Zoorob and Cender, 1998] and NMDA [Wood, 2005] antagonists. However many questions regarding the mechanism of action remains to be understood [Siddall, 2008]. Several neuropeptides were reported to be associated with neuropathic and chronic pain mechanisms. Peptides like substance P, CCK, CGRP, VIP and neurotensin have been investigated as potential biomarkers [Beaudry *et al.*, 2007; Vachon *et al.*, 2004]. However, the results showed that mechanical allodynia following sciatic nerve cuff implantation in rats [Pitcher *et al.*, 1999] is associated to an up-regulation in spinal lumbar tissue of CCK₂₆₋₃₃ and substance P but only substance P concentration decreased with early

dexamethasone treatment [Beaudry *et al.* 2007]. These preliminary results suggest that substance P plays a significant role in pain transmission and monitoring substance P concentration could be a good indicator of treatment efficacy. These early findings provided the basis to further explore neuropeptides regulation in the central nervous system, more specifically in the lumbar spinal cord. Moreover, many types of drugs targeting various receptors were tested to treat pain following traumatized nervous tissue in neuropathic animals, however outcomes were very often disappointing [Siddall 2008].

Substance P is known to have a prominent role in neurotransmission of nociceptive stimuli [Fürst, 1999]. It is found in the primary afferents fibers that terminate in the substantia gelatinosa of the dorsal spinal cord [Barber *et al.*, 1979; Hokfelt *et al.*, 1976]. Following the stimulation of A δ and C fibers, substance P is released in cerebrospinal fluid [Yaksh *et al.*, 1980]. It was demonstrated that drugs that inhibit its release produced analgesia following spinal injections [Yamamoto and Yaksh, 1991]. Similar to substance P, CGRP also is involved in pain transmission mechanism and produces slow depolarization of spinal dorsal horn neurons and may potentiate the depolarization effect of glutamate [Ai *et al.*, 1998]. Additionally, substance P and CGRP are co-localized in the laminae I and II neurons [Guo *et al.*, 1999]. Neutralizing antibodies to CGRP injected directly in the spinal cord can produce antinociceptive effects suggesting a role in analgesia [Dray, 1992; Dray and Urban, 1996; Kuraishia *et al.*, 1988]. Substance P and CGRP are considered important neuropeptides that play a central mechanistic role in neuropathic pain development and maintenance.

Dynorphin A, one of the major proteolytic fragments of prodynorphin [Civelli *et al.*, 1985], is an endogenous ligand of the kappa (κ) and mu (μ) opioid receptors [Beaulieu, 2005]. The agonist activity of dynorphin A reduces significantly neuronal activity [Chavkin *et al.*, 1984]. However, the concentration of dynorphin A into the spinal cord can be modulated rapidly [Cho and Basbaum, 1998]. Several studies using experimental models of chronic and neuropathic pain show significant increase of dynorphin A concentration in the spinal cord. These studies include inflammatory pain [Ruda *et al.*, 1988], neuropathic pain [Kajander *et al.*, 1990; Malan *et al.*, 2000], spinal cord trauma [Abraham *et al.*, 2001;

Tachibana *et al.*, 1998] and arthritis [Weihe *et al.*, 1989]. The importance of opioid receptors in the control of pain and somatosensory processes is widely accepted [Fürts, 1999]. Activation of opioid receptors results in the inhibition of the opening of calcium channel present within primary afferent neurones and play a role in the modulation of the release of neurotransmitters (e.g. neuropeptides). The interaction of dynorphin A and opioid receptor may therefore affect the concentration of substance P and CGRP observed in the lumbar spinal cord.

In biological sciences, the use of electrospray (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) has become very popular because of their performance with analyses of complex biological mixtures [Cañas *et al.*, 2006]. The coupling of ESI with high performance liquid chromatography (HPLC) as an interface to tandem or hybrid mass spectrometers led to the development of new LC-ESI-MS/MS techniques for proteins and peptides analysis [Cravatt *et al.* 2007]. The analyses of peptides are routinely performed on time of flight (TOF), triple-quadrupole (QQQ), and quadrupole ion trap (QIT) mass spectrometers [Khalsa-Moyers and McDonald, 2006]. MALDI-TOF mass spectrometers provide rapid and accurate (<10 ppm) molecular mass of peptides. However, traditional MALDI-TOF instrument does not provide rich CID spectra but newer instrument such as MALDI-TOF/TOF can minimize this important limitation [Cotter *et al.*, 2007]. On the other hand, the MS/MS capabilities are one of the principal strength for QQQ and QIT mass spectrometers allowing identification of peptides at low concentration in complex mixtures. Moreover, QQQ and QIT instruments quantitative performance are excellent showing dynamic linear range from 3 to 5 orders of magnitudes [Hopfgartner and Bourgogne, 2003]. In the present study, we are particularly interested to simultaneously characterise, identify and quantify three specific neuropeptides namely substance P, CGRP and dynorphin A in rat spinal cord. Shotgun approaches has been proposed [Hu *et al.* 2007; Chen 2008], however despite providing a comprehensive expression profile for detail statistical analysis, the quantitative merits are limited and the data generated is complex and increasingly difficult to rationalize within a specific pharmacological model.

3. Experimental

3.1. Reagents

Substance P, CGRP, and dynorphin A were purchased from Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA, USA) and the internal standard tylosine was purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Other chemicals, including acetonitrile, hexane, trifluoroacetic acid, and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

3.2. Stock Solution

Neuropeptides were dissolved in a 0.1% (v/v) TFA/water solution (100 µg/mL) and tylosine was dissolved in water (100 µg/mL). The neuropeptide stock solutions (100 µg/mL) were diluted in 0.25 % (v/v) TFA/water for standard preparation. The tylosine stock solution was diluted in acetonitrile at a concentration of 500 ng/mL and was used as an internal standard solution.

3.3. Instrumentation

The HPLC system consisted of a Thermo Surveyor autosampler and a Thermo Surveyor MS pump (San Jose, CA, USA). The QIT system used was a Thermo LCQ Advantage (San Jose, CA, USA). Data was acquired on a Dell Optiplex desktop computer (Round Rock, TX, USA) equipped with operation system Windows XP professional. Data acquisition and analysis were performed using XCalibur 1.4 (San Jose, CA, USA). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighted (1/x) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the analyte and the internal standard.

3.4. Standard Curve Preparation

The determination of precision and accuracy of a quantitative analytical method for endogenous substances can represent additional challenge mainly due to the lack of control biological matrix free of molecules of interest normally used for the preparation of calibration standards and control samples. Therefore, we must take into account the endogenous basal concentrations and prepare our standard into an alternative solution. The most convenient solution was to use 0.25%TFA solution since this is the solution used for tissue homogenization. The TFA solution was fortified from 7 to 350 pmol/mL, 65 to 6500 pmol/mL and 25 to 1160 pmol/mL for substance P, CGRP and dynorphin A respectively. The assay recovery along with an evaluation of assay precision and accuracy were determined using calibration standards prepared in an alternative matrix and fortified rat spinal cord homogenates with a known amount of neuropeptides. The fortified samples were analyzed along with naïve samples in order to establish the endogenous level and determine the method accuracy.

3.5. Spinal Cord Sample Preparation

The lumbar region of the spinal cord of male Sprague Dawley rats (n=8) was rapidly collected following deep anesthesia with isoflurane. Spinal cord samples were immediately frozen in cold hexane (kept into a dry ice bath) and stored at -80°C pending analyses. Following the collection, the tissues were weighted frozen and homogenized. Rat spinal cords were weighted accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of 0.25% TFA solution at a ratio of 1:5 (w:v). The samples were sonicated for 15 min and 200 μL of the homogenate was mixed with 200 μL of an internal standard solution (500 ng/mL of tylosine in acetonitrile). The samples were vortex and centrifuged at 12 000g for 10 min and the supernatant was transferred into an injection vial for analysis.

3.6. Chromatographic Conditions

A gradient mobile phase was used with a microbore column Thermo Biobasic C8 10 x 1 mm with particle size of 5 μm . The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and 0.2% formic acid in water at a ratio of 0:100, respectively. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 0:100. From 1 to 20 min a linear gradient was applied up to a ratio of 40:60 and maintained for 2 min. The mobile phase composition ratio was reverted the initial condition and the column was allowed to re-equilibrate for 10 min for a total run time of 32 min. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ and substance P eluted at 16.3 min, CGRP at 18.2 min, dynorphin A at 14.1 min and the internal standard (tylosine) at 18.5 min. Two μL (full loop mode) of samples were injected and the total run time was set at 32 min.

3.7. Mass Spectrometry Conditions

The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The sheath gas was set to 5 units and the ESI electrode was set to 4000 V. The capillary temperature was set at 300 $^{\circ}\text{C}$, the capillary voltage to 6 V and the collision energy was set at 30% for neuropeptides and 35% for tylosine (internal standard). The mass spectrometer operated for quantitative analysis in selected reaction monitoring (SRM) mode using four segment analysis (674 \rightarrow [254+600] for substance P, 952 \rightarrow [963+1215] for CGRP, 716 \rightarrow [630+944] for dynorphin A and 917 \rightarrow 772 for internal standard tylosine), an isolation width of 3 Da and the maximum injection time was set to 200 ms.

4. Results and Discussion

4.1. Characterization of Neuropeptides by Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry

Full scan and product ion mass spectra for substance P, CGRP, dynorphin A and tylosin (internal standard) were obtained in positive ion mode. The full scan electrospray mass spectrum of substance P showed the formation of multiply charged ions ($[M+nH]^{n+}$) at m/z 1348 (+1), 674 (+2) and 450 (+3) compatible with the molecular weight of substance P (). The product ion spectrum of m/z 674 (substance P $[M+2H]^{2+}$) revealed specific fragment ions from the main fragmentation schemes of peptides at m/z 1094 (y_9), 1087 (b_9), 1029 (b_8), 883 (b_7), 736 (b_6), 607 (b_5), 600 (b_{10}^{2+}), 586 (a_{10}^{2+}), 483 (y_4^{2+}), 479 (b_4), 382 (b_3), 354 (a_3) and 254 (b_2) (Figure 1). The product ion spectrum of substance P showed predominant fragment ions at m/z 600 and 254. The full scan electrospray mass spectrum of CGRP showed the formation of multiply charged ions ($[M+nH]^{n+}$) at m/z 1269 (+3), 952 (+4) and 762 (+5) and the deconvoluted spectrum was compatible with CGRP molecular weight. The product ion spectrum of m/z 952 (CGRP $[M+4H]^{4+}$) revealed specific fragment ions at m/z 1215 (b_{36}^{3+}), 1191 (b_{35}^{3+}), 1142 (b_{23}^{2+}), 1100 (c_{22}^{2+}), 963 (y_{19}^{2+}), 921 (y_{29}), 911 (z_{20}^{2+}), 825 (x_{23}^{2+}) and 643 (b_{12}^{2+}) (Figure 2). The product ion spectrum of CGRP showed predominant fragment ions at m/z 1215 and 963. Finally, the full scan electrospray mass spectrum of dynorphin A showed the formation of multiply charged ions ($[M+nH]^{n+}$) at m/z 1075 (+2), 717 (+3) and 538 (+4) and the deconvoluted spectrum was consistent with dynorphin A molecular weight. The product ion spectrum of m/z 717 (dynorphin A $[M+3H]^{3+}$) revealed specific fragment ions at m/z 944 (b_{15}^{2+}), 936 (y_4^{2+}), 794 (b_{13}^{2+}), 668 (b_{16}^{3+}), 630 (b_{15}^{3+}), 591 (b_{14}^{3+}), and 560 (b_9^{2+}) (Figure 3). The product ion spectrum of dynorphin A showed predominant fragment ions at m/z 944 and 630. The product ion spectra were compatible with the molecular structure of all three neuropeptides. Other fragments associated with internal fragmentation were also observed but only the main CID fragmentation paths of peptides were used during this study. The mass transition for quantitation in SRM mode was set for best sensitivity at 674

→ [600+254], 952 → [1215+963] and 717 → [944+630] for substance P, CGRP and dynorphin A respectively.

4.2. Identification of Neuropeptides by Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry in Rat Spinal Cord

Substance P, CGRP and dynorphin A in spinal cord samples were analyzed using full scan MS/MS analysis. The product ion spectra were compared with reference spectra to positively identify the presence of each neuropeptides. Product ion spectra of m/z 674 (substance P) performed with rat spinal cord samples revealed the presence of specific fragments at m/z 1095 (y_3), 1089 (b_9), 883 (b_7), 607 (b_5), 600 (b_{10}^{2+}), 478 (b_4), 382 (b_3) and 254 (b_2) for a peak observed at expected retention time (16.2 min) of substance P (Figure 4). The fragments observed were compatible with CID spectrum of reference material and the presence of b fragment series further increase of the confidence into the positive identification of substance P in rat spinal cord. Product ion spectra of m/z 952 (CGRP) performed with rat spinal cord samples revealed the presence of specific fragments at m/z 1215 (b_{36}^{3+}), 1191 (b_{35}^{3+}), 1141 (b_{23}^{2+}), 1100 (c_{22}^{2+}), 963 (y_{19}^{2+}) and 911 (z_{20}^{2+}) for a peak observed at expected retention time (18.1 min) of CGRP (Figure 5). The fragments observed were compatible with CID spectrum of reference material and support the positive identification of CGRP in rat spinal cord. Product ion spectra of m/z 717 (dynorphin A) collected from rat spinal cord samples revealed the presence of specific fragments at m/z 944 (b_{15}^{2+}), 936 (y_4^{2+}), 668 (b_{16}^{3+}), 630 (b_{15}^{3+}), 591 (b_{14}^{3+}), and 560 (b_9^{2+}) for a peak observed at expected retention time (14.0 min) of dynorphin A (Figure 6). The fragments observed were compatible with CID spectrum of reference material. Moreover, the presence of b fragment series further increased the positive identification of dynorphin A in rat spinal cord. Extracted ion chromatogram (XIC) illustrated in Figure 4, 5 and 6 suggested selected mass transitions of 674 → [600+254], 952 → [1215+963] and 717 → [944+630] for substance P, CGRP and dynorphin A were adequate for selective isolation and quantitative analysis.

4.3. Quantitative Determination of Neuropeptides in Rat Spinal Cord

Based on previous results [Beaudry and Vachon, 2006], a ratio of 1:1 (homogenate: acetonitrile) was used for the sample preparation procedure along with a centrifugation step to maximize peptide recovery and avoid the presence of particles. A linear regression (weighted $1/x$) was judged to produce the best fit for the concentration-detector relationship. The calculated coefficients of correlations (r) ranged from 0.990 to 0.999. The recovery and reproducibility of the method were evaluated by analyzing six replicates of rat spinal cord homogenates fortified with neuropeptides mixture at the nominal concentration of 50, 100 and 200 pmol/g (weight of tissue) for Substance P; 1000, 2000 and 5000 pmol/g for CGRP; 500, 1000 and 2000 pmol/g for dynorphin A. To calculate the accuracy, the endogenous level needed to be subtracted from the observed concentration of fortified rat spinal cord tissues ($\%NOM = ([\text{measured concentration}] - [\text{endogenous concentration}]) / [\text{fortified concentration}] * 100$). The precision ($\%CV$) and accuracy ($\%NOM$) observed ranged from 10.9 to 14.4%, 8.9 to 14.2%, 8.8 to 13.0% and 91.0 to 110.2%, 97.2 to 107.3%, 91.8 to 97.3% for substance P, CGRP and dynorphin A respectively. Following the analysis of rat spinal cords, the mean endogenous concentrations were 110.7 pmol/g (SEM = 56.3), 2541 pmol/g (SEM = 312.6) and 779.4 pmol/g (SEM = 118.8) for substance P, CGRP and dynorphin A respectively. The mean weight of tissues analyzed was 0.184 g (SEM = 0.004). The results obtained suggest that the method provides adequate figures of merit to support targeted peptidomic studies aimed to determine neuropeptide regulation in animal neuropathic and chronic pain models. It will contribute in providing better mechanistic understanding and in developing a more rational approach to drug discovery.

5. Conclusion

A novel high-performance liquid chromatographic quadrupole ion trap mass spectrometric method was developed to identify and quantify simultaneously substance P, CGRP and dynorphin A in rat spinal cord. The method provides acceptable figures of merit. Moreover, full scan MS/MS spectrum provided structural information and a mean to positively identify the neuropeptides in spinal cords using specific fingerprint CID fragments obtained from the amino acid sequence, the acknowledged mechanism of fragmentation of peptides and reference spectra. Shotgun peptidome analysis using isotope coded affinity tag (ICAT)-based peptide profiling offer certainly new opportunities to explore neuropeptides regulation. However, targeted neuropeptide analyses provide an improved quantitative alternative and offer the opportunity to study a specific neurotransmission mechanism relevant to the pharmacological model used.

6. Acknowledgments

The authors would like to thank both the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ) and the Canadian Arthritis Network (CAN) for their financial support.

7. References

- Abraham, K.E., McGinty, J.F. and Brewer, K.L., The role of kainic acid/AMPA and metabotropic glutamate receptors in the regulation of opioid mRNA expression and the onset of pain-related behavior following excitotoxic spinal cord injury. *Neuroscience* 2001;104: 863–874.
- Ai, X., MacPhedran, S.E. and Hall, A.K., Depolarization stimulates initial calcitonin gene-related peptide expression by embryonic sensory neurons In Vitro. *Journal of Neuroscience* 1998;18:9294-9302.
- Barber, R.P., Vaughn, J.E., Slemmon, J.R., Salvaterra, P.M., Roberts, E. and Leeman, S.E., The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 1979;184: 331-352.
- Beaudry, F. and Vachon, P., Determination of substance P in rat spinal cord by high-performance liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 2006;20(12):1344-1350.
- Beaudry, F, Girard, C and Vachon, P., Early dexamethasone treatment following sciatic nerve cuff implantation decreases substance P in lumbar spinal cord of rats with neuropathic pain. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2007;71:90-97.
- Beaulieu, P., *Pharmacologie de la douleur*, published by *Les Presses de l'Université de Montréal* 2005, Montréal, Canada. PP 593
- Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E.R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I.A., van Ommen, B, and Smilde, A.K., Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical Chemistry* 2006;78(2):567-574.
- Bischoff, R. and Luiders, T.M., Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *Journal of Chromatography B* 2004;803(1):27-40.

Calvo, K.R., Liotta, L.A. and Petricoin, E.F., Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. *Bioscience Reports* 2005;25(1-2):107-125.

Cañas, B., Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Camafeita, E. and Calvo, E., Mass Spectrometry Technologies for Proteomics. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2006;4(4):295-320.

Chavkin, C., James, I.F. and Goldstein, A., Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 1982;215:413–415.

Chen CH, Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Analytical Chemica Acta* 2008;624:16-36.

Cho, H.J., and Basbaum, A.I., Increased staining of immunoreactive dynorphin cell bodies in the deafferented spinal cord of the rat. *Neuroscience Letter* 1988;84: 125–130.

Civelli, O., Douglass, J., Goldstein, A., and Herbert, E., Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82:4291–4295.

Cotter, R.J., Griffith, W. and Jelinek, C., Tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometry and the curved-field reflectron. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007;855(1):2-13.

Cravatt, B.F., Simon, G.M. and Yates, J.R., The biological impact of mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2007;450(13):991-1000.

Dray, A., Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Science* 1992;51:1759-1765.

Dray, A. and Urban, L., New pharmacological strategies for pain relief. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1996;36:253-280.

- Fürst, S., Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin* 1999;48(2):129-141.
- Guerrera, I.C. and Kleiner, O., Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience Report* 2005;25(1-2):71-93.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. and Elde, R., Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience* 1999;11:946-958.
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G. and Arimura, A., Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1976;1:131-136.
- Hopfgartner G and Bourgoigne E., Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review* 2003;22(3):195-214.
- Hu L, Ye M, Jiang X, Feng S, Zou H., Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis. *Analytica Chimica Acta* 2007;598:193-207.
- Kajander, K.C., Sahara, Y., Iadarola, M.J. and Bennett, G.J., Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides* 1990;11:719-728.
- Khalsa-Moyers, G. and McDonald, W.H., Developments in Mass Spectrometry for the Analysis of complex protein Mixtures. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2006;5(2):98-111.
- Korfmaker, W.A., Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today* 2005;10(20):1357-1367.
- Kuraishia, Y., Nanayamaa, T., Ohnoa, H., Minamia, M., and Satoh, M., Antinociception induced in rats by intrathecal administration of antiserum against calcitonin gene-related peptide. *Neuroscience Letters* 1988;92(3):325-329.

Malan, T.P., Ossipov, M.H., Gardell, L.R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai, J. and Porreca, F. Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain* 2000;86:185–194.

Pitcher, G.M., Ritchie, J. and Henry, J.L., Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 1999;83:37–46.

Ruda, M.A., Iadarola, M.J., Cohen, L.V. and Young, W.S., In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:622–626.

Siddall, P.J., Management of neuropathic pain following spinal cord injury: now and in the future. *Spinal Cord* 2008;1-8 (published online November 11, 2008)

Tachibana, T., Miki, K., Fukuoka, T., Arakawa, A, Taniguchi, M., Maruo, S. and Noguchi, K., Dynorphin mRNA expression in dorsal horn neurons after traumatic spinal cord injury: temporal and spatial analysis using in situ hybridization. *Journal of Neurotrauma* 1998;15:485–494.

Vachon, P., Massé, R. and Gibbs, B.F., Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2004;68(2):86-92.

Weihe, E., Millan, M.J., Holtt, V., Nohr, D. and Herz, A., Induction of the gene encoding pro-dynorphin by experimentally induced arthritis enhances staining for dynorphin in the spinal cord of rats. *Neuroscience* 1989;31:77–95.

Wood ,P.L., The NMDA receptor complex: a long and winding road to therapeutics. *IDrugs* 2005; 8(3):229-35.

Yaksh, T.L., Jessell, T.M., Gamse, R., Mudge, A.W. and Leeman, S.E., *Nature* 1980;286(5769):155-157

Yamamoto, T. and Yaksh, T.L., Stereospecific effects of a nonpeptidic NK1 selective antagonist, CP-96,345: antinociception in the absence of motor dysfunction. *Life Science* 1991;49(26):1955-1963.

Zoorob, R.J. and Cender, D., A different look at corticosteroids. *American Family Physician*, 1998;58(2):443-450.

Figure 1. CID spectrum of substance P for m/z 674 $[M+2H]^{2+}$

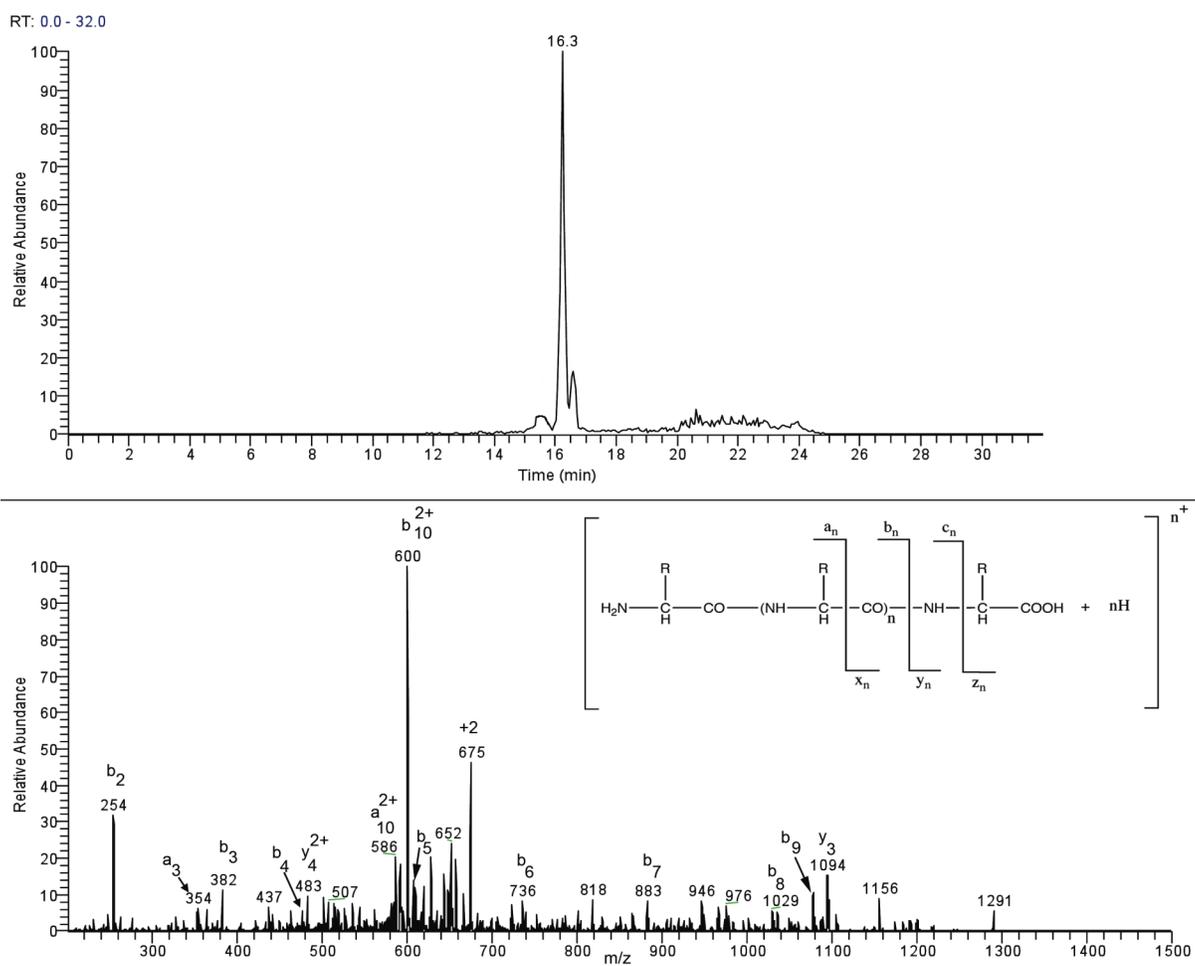


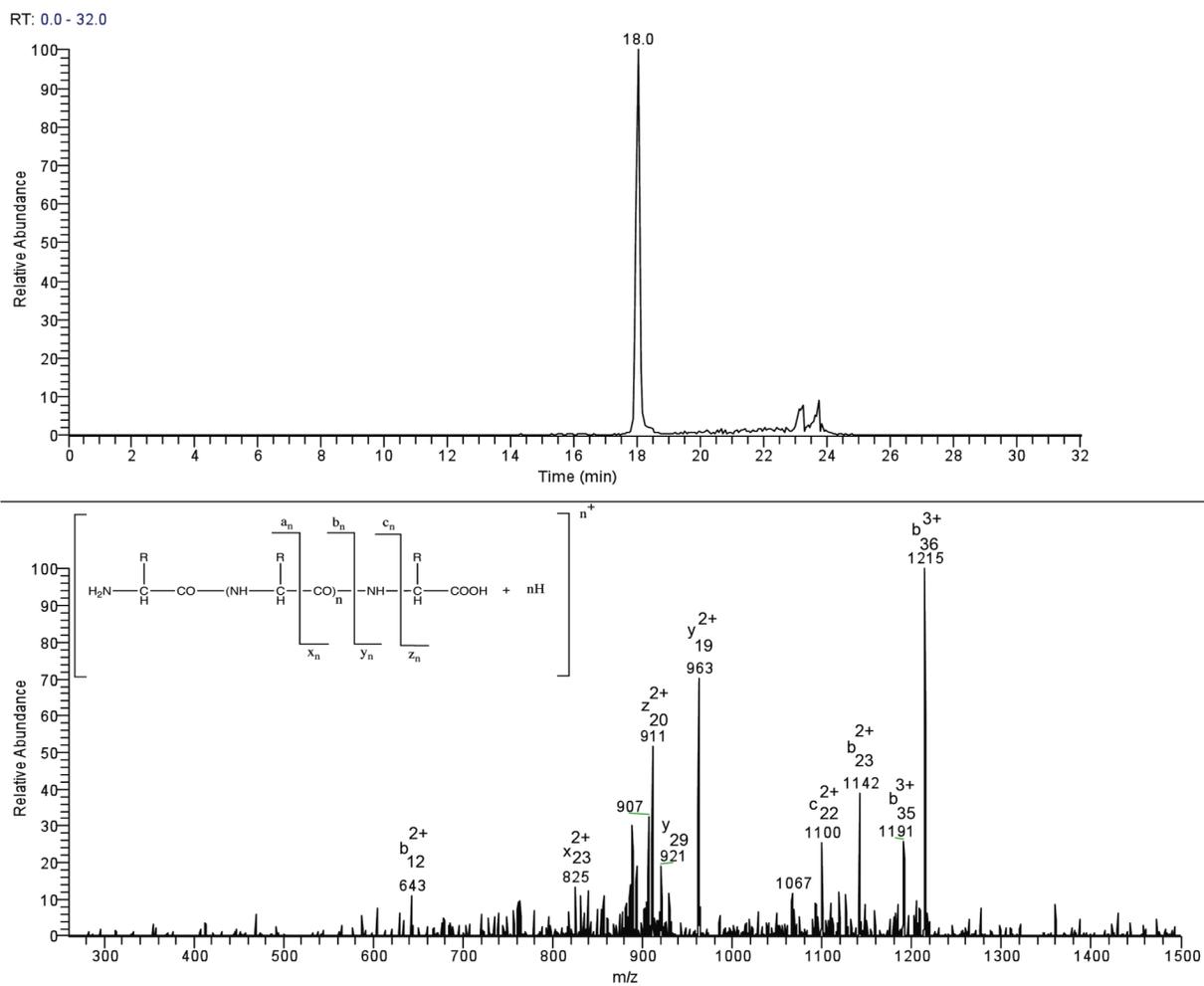
Figure 2. CID spectrum of CGRP for m/z 952 $[M+4H]^{4+}$ 

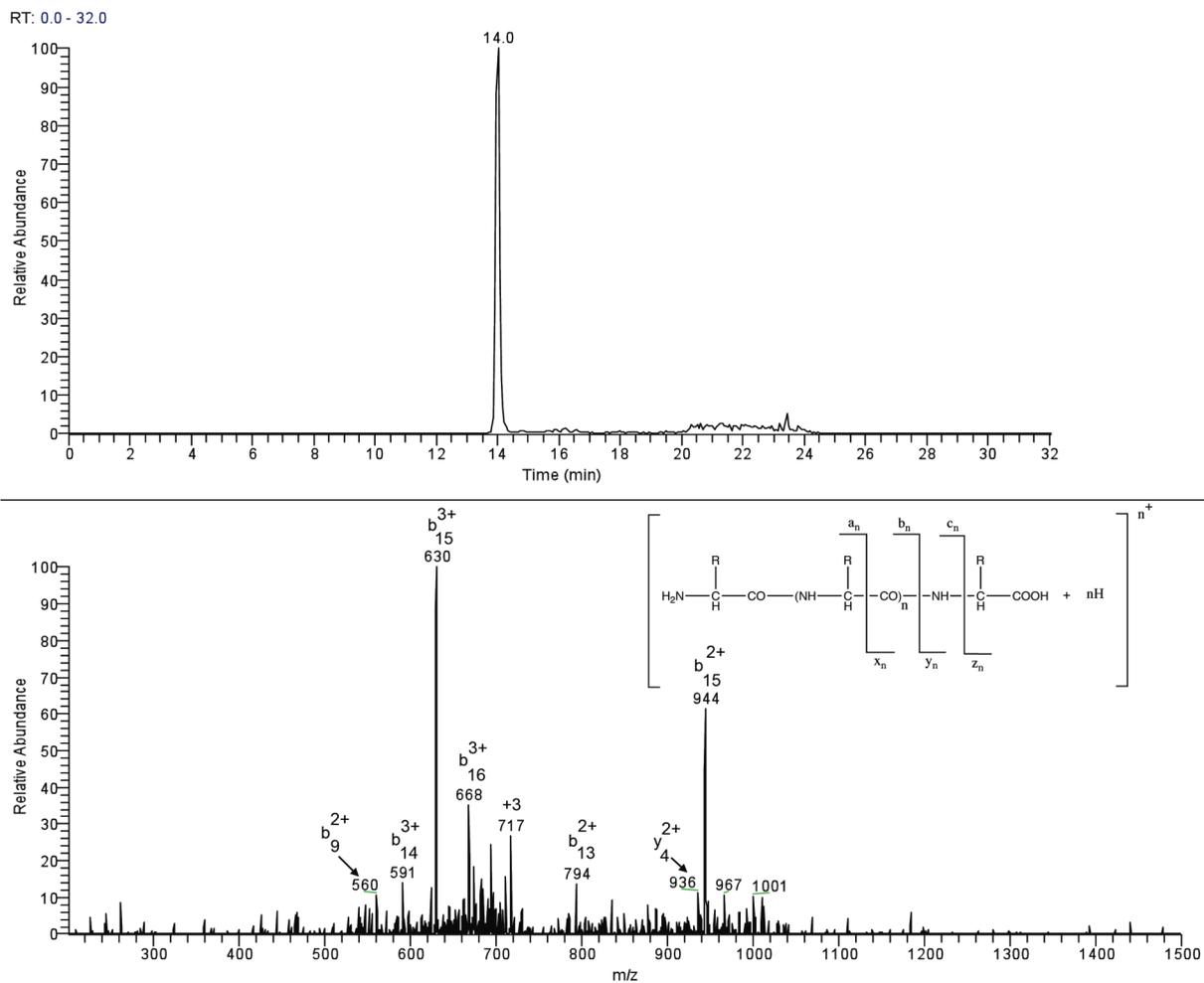
Figure 3. CID spectrum of dynorphin A for m/z 716 $[M+3H]^{3+}$ 

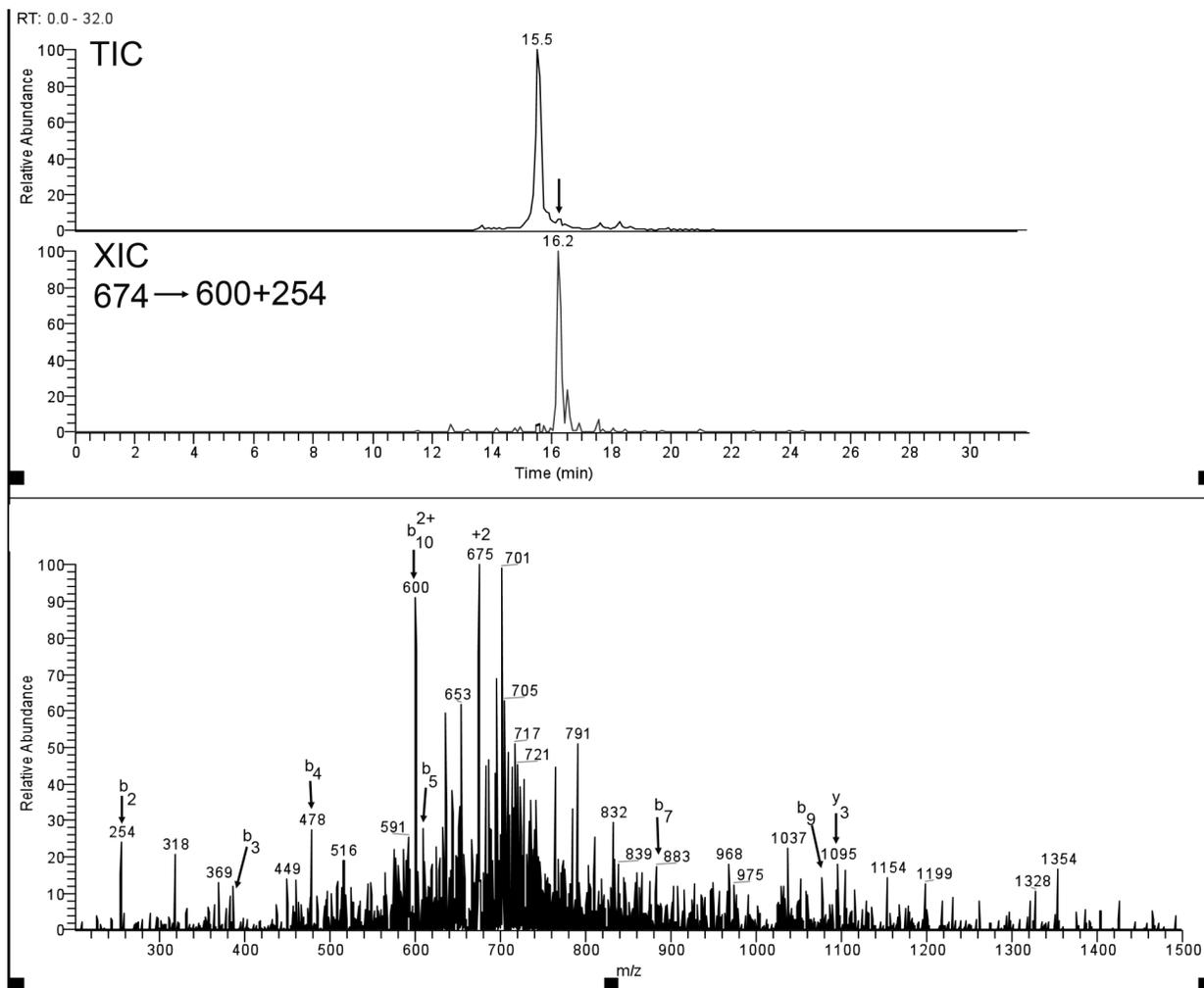
Figure 4. MS² identification of substance P in rat spinal cord

Figure 5. MS² identification of CGRP in rat spinal cord

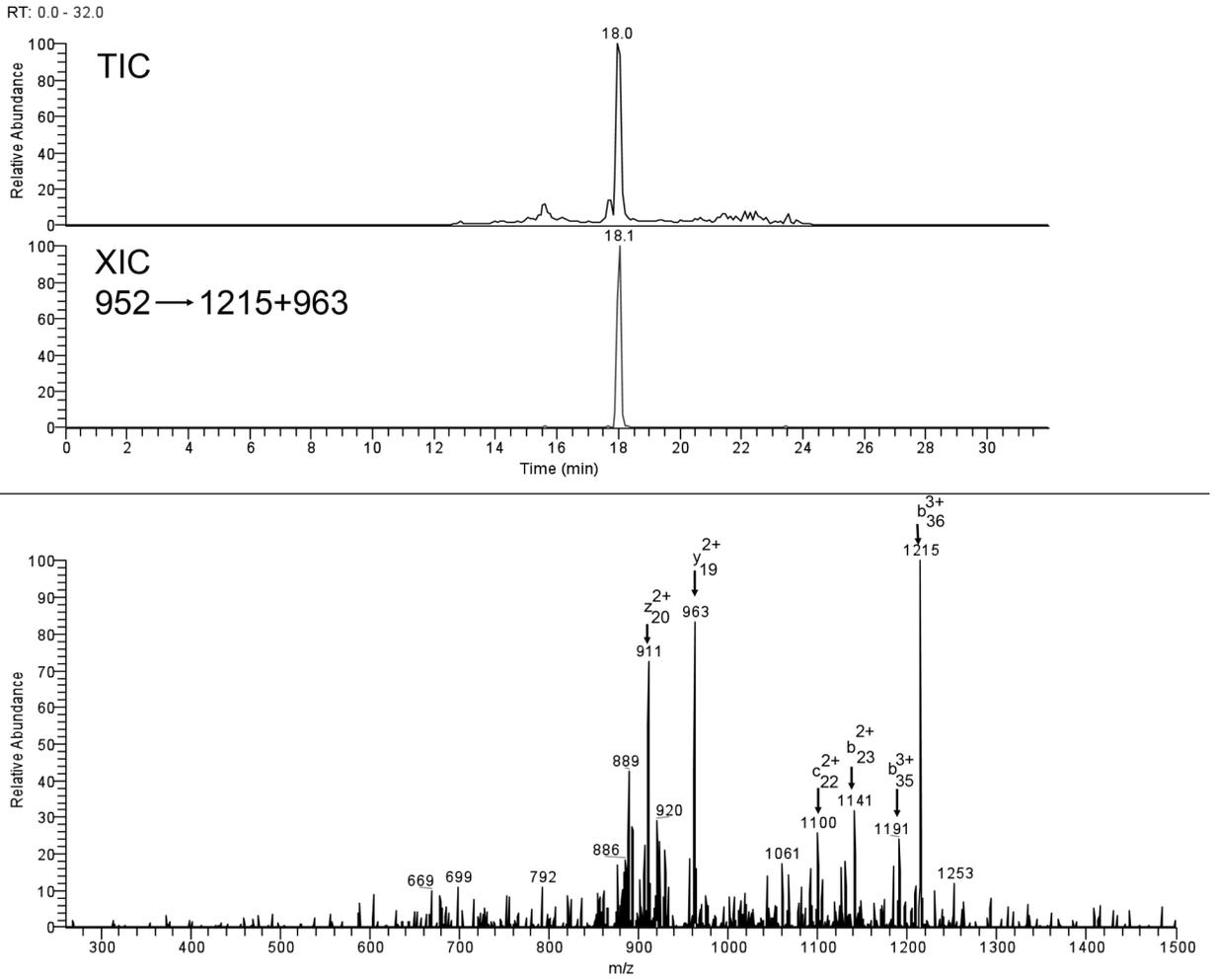


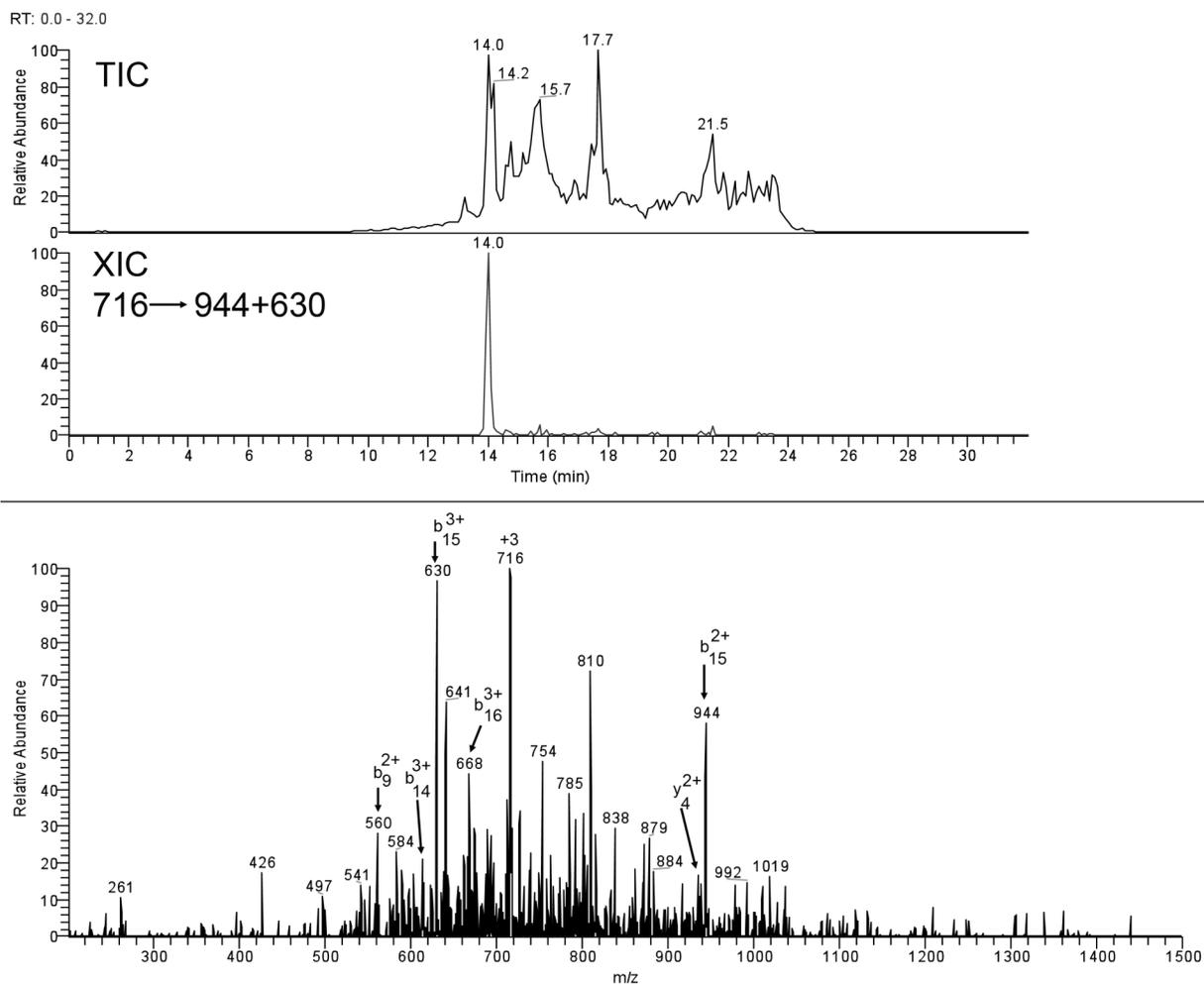
Figure 6. MS² identification of dynorphin A in rat spinal cord

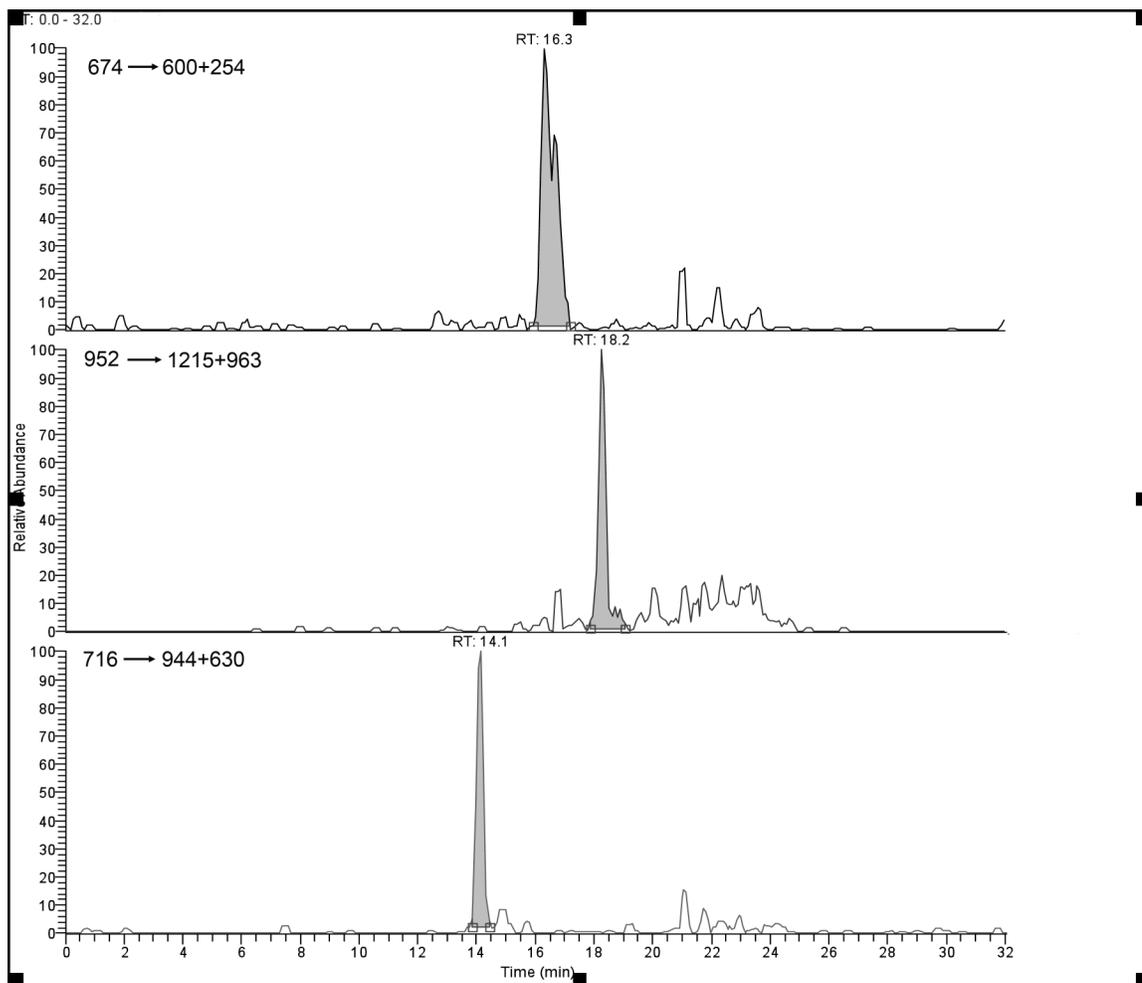
Figure 7. Example of LOQ chromatogram

Table I. Amino acid sequence of selected neuropeptides

Neuropeptide	Amino Acid Sequence (1 letter code)
Substance P	RPKPQQFFGLM(NH ₂)
CGRP	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF(NH ₂) [Disulfide bridge: 2-7]
Dynorphin A	YGGFLRRIRPKLKWDNQ

ANNEXE II

Université de Montréal

Critical Appraisal

of the scientific communication

entitled

**« Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate
rat model for osteoarthritis pain »**

Authors : Beyreuther B, Callizot N and Stöhr T.

Published in Arthritis Research & Therapy 2007, 9 :R14

by

Catherine Estelle FERLAND-LEGAULT

Département de biomédecine

Faculté de médecine vétérinaire

Presented to the jury members
as part of the general synthesis examination
of the Veterinary Sciences Doctoral program

Dr Pascal Vachon

Dre Sheila Laverty

Dr Francis Beaudry

Dr Alexander El Warrack

Dr Anthony Robin Poole, McGill University

9 Avril 2010

© Catherine E. Ferland, 2010

1. Introduction

In this study, Beyreuther et al. (2007) investigated the antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model of osteoarthritic pain by investigating the behavioral pain response of the treated animals. This is a relevant study, since lacosamide as a potent treatment for pain related to osteoarthritis (OA) has not been previously reported. This research article targets those working in the field of OA and current treatments to alleviate joint pain. It is mainly addressed to researchers in the field of preclinical pharmacology. The journal in which the article has been published has a considerable impact factor of 4.04, and the authors have been in the pain research field for several years prior to this publication. Beyreuther et al. are affiliated with the pharmaceutical industry.

The authors start their article by introducing the OA pathology. Osteoarthritis is the most common joint disease and is associated with loss of joint function and diminished quality of life caused by painful joints. Joint pain is the most common complaint of individuals with OA (Kidd 2003). The authors bring the pertinent point that the pathophysiology behind the structural changes associated with the disease is however complex and the link to pain remains poorly understood. However, there is no discussion of what causes joint pain. By introducing the pain mechanisms and how pain is generated in the joint the authors would have helped the readers to understand how a drug can act at the peripheral and central levels.

In OA, afferent nerve fibers located in the joint have enhanced activity when a noxious stimulation is applied to the innervated structures of the joint. Noxious stimulation may result of mechanical (pressure, range of motion, touch), thermal or chemical stimuli caused by the release of pro inflammatory substances in the joint. It is thought that the heightened pain sensitivity is the result of sensitization of the nociceptive system (Schaible et al. 2002). This increase in sensitization of joint primary afferents can eventually lead to pain phenomena such as allodynia (pain elicited by stimuli that are normally below pain threshold) and/or hyperalgesia (stronger pain than normal evoked by stimuli intensity normally not sufficient to elicit pain).

Fibers responding to noxious stimuli are small diameter myelinated A δ and C fibers expressing ion channels at their terminals for the transduction of stimuli and generation of action potentials. If noxious stimuli or inflammatory conditions persist, the expression of ion channels and receptors may change. An increased activation of ion channels and an up-regulation of excitatory receptors may contribute to the maintenance of pain (Schaible 2007).

The introduction lacks a meaningful discussion of pain related to OA, which is necessary in order to understand how the drugs, discussed later in the article, act. There are different types of pain encountered in OA leading to different pharmacological approaches, although several types may be contributing to the perception of pain at any point in time. Nociceptive pain is transient and may appear in the absence of any intentional stimulation (spontaneous pain). It is elicited by the stimulation of sensory nerve endings in the tissue. Inflammatory pain is explained by the presence of hyperalgesia associated with the tissue repair process following a tissue injury whereas neuropathic pain implies the nervous system and results from injury or disease of neurons in the peripheral or central nervous system (Marchand 2005). Another important mechanism of pain is the distinction between acute versus chronic pain. This difference is relevant to analgesic drug treatment efficacy and has to be discussed or taken into account.

Since there are no treatments available to minimize the progression of OA on the market, the first line treatment remains analgesia to reduce the symptoms (Wieland et al. 2005). In their introduction, the authors discuss non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), with acetaminophen being the most widely used drug, but also mention that cyclooxygenase 2 inhibitors (COXIBs), steroids and opiates are also prescribed. The authors provide only a superficial discussion of the analgesics available and fail to explain why there is the need to pursue analgesic drugs research in the field of OA. In the majority of patients, these analgesic drugs do not provide full pain relief and/or have significant side effects. The NSAIDs are a well established treatment for pain relief and diminution of

inflammation. The COX-2 selective NSAIDs are found to be similar to non-selective NSAIDs for the symptomatic relief although COX-2 selective drugs provide superior gastrointestinal tolerance due to their specificity (Chen et al., 2008). However, this line of treatment is still often associated with myocardial and gastrointestinal side effects, and it does not provide satisfactory pain relief in some patients. Consequently, opioid analgesics are useful alternatives to patients in whom NSAIDs are poorly tolerated. However, the increased risk of side effects has to be taken seriously, especially with the elderly (Wiehland et al. 2005).

Beyreuther et al. (2007) mentioned that several animal models have been established without going into details. Various OA models are used depending of the goal of the study i.e. disease modifying osteoarthritis drugs (DMOADs) or symptomatic relief drugs (SRDs). Various rodent models are commonly used by the industry to study therapeutic drugs for human OA. In spontaneous or surgically induced OA animal models, the pain and joint degeneration develops over weeks (Bendele et al. 1999, in-house observations in Ferland et al. 2010), making their use time consuming and expensive. Therefore, most of the studies aiming to evaluate a compound's efficacy to alleviate pain are using chemically induced OA models as they provide a faster and easier way of profiling a compound. Some models are renowned for their established fast inflammatory phase (carrageenan, complete Freund adjuvant) whereas others are able to provide acute and chronic pain states as time goes by (monosodium iodoacetate (MIA)).

The authors are referring to the MIA model as one of the best characterized rat models for analyzing properties of drugs for OA studies. Human OA has a long-term progression which is not reflected by the MIA model, making the use of this model more for discerning therapeutic approaches for OA pain treatment than for disease modification strategy (Bove et al. 2009). Consequently, the choice of the rodent model is appropriate for the purpose of the article's study.

The authors mentioned the mechanisms of action of MIA which inhibits the glycolysis of chondrocytes, resulting in cell death. The MIA model provides a fast and clear nociceptive response and is often used at different doses according to one's study objective. There is a direct relationship between the concentration of MIA injected in the joint and the afferent nerve fiber activity (Schuelert and McDougall 2009) i.e. the highest dose commonly used (3mg) leads to the greatest pain response, giving the ability to control the disease severity but also to gradate the intensity of the nociceptive response. Furthermore, the MIA model is a biphasic model, with an inflammatory component marked within the first days after the intra-articular injection and resolving after a week, followed by an established pain state due to structural changes within the joint (Combe et al. 2004). In their study, the authors are looking at the pharmacological modulation of pain at day 3, 7 and 14 post OA induction. These time points are relevant to observe the pharmacological modulation of pain in a tested treatment, and have been used in previous studies (Bove et al. 2003). However, to fully characterize a compound's mode of action, it would have been of interest to look at other days between these time points, and also at later time points to evaluate the chronic nociceptive response to the treatment.

Currently, there are no DMOADs approved on the market, therefore the various pharmacological treatments focus on pain alleviation to reduce functional impairment. The most widely used treatments for OA pain are the NSAIDs, opioids and steroids. However patients still often report a lack of pain relief and these current analgesics are often associated with considerable side effects. Expanding research has demonstrated that diverse pain mechanisms are involved and so it is now clear that pain associated with OA is an heterogeneous phenomenon. Consequently, the miracle treatment to alleviate pain remains still out of reach, and emerging compounds in development are currently being tested by the pharmaceutical industry, with some already in late stage development (Hellio-LeGraverand-Gastineau 2009).

Although it is not clearly mentioned in the introduction of the article, the main problematic in OA pain research is not only the lack of effective analgesics, with minimized side effects, but also the understanding of the pain mechanisms involved in the

induction and maintenance of pain-related to the pathology. As the authors mentioned, in order to improve our knowledge of those mechanisms it is mandatory to improve the characterization of animal models and treatment strategies. Effective pain relief in OA has still not been achieved.

The aim of the study, which is clearly mentioned, is to evaluate the ability of lacosamide in the MIA rat model to reduce pain behavior in comparison with classical morphine and diclofenac treatments. By comparing lacosamide to the other treatments, the authors are investigating a new treatment avenue.

Anticonvulsant drugs (synonym of antiepileptic) are an established treatment for neuropathic pain. The main mechanisms of action of anticonvulsant drugs are an enhancement of GABA action, inhibition of calcium channel function and an inhibition of sodium channel function (Rang et al. 2007). Some anticonvulsants have been already tested for osteoarthritis related analgesia in animal models. Although, only gabapentin, acting on the calcium channels, has been reported to effectively reverse allodynia in the MIA model (Fernihough et al. 2004).

Lacosamide is introduced in the article as a member of a group of functionalized amino acids, specifically synthesized as anticonvulsive drug candidates. However, the authors fail to discuss the mechanism of action of the drug, although they note its efficacy in animal models for inflammatory and neuropathic pain, with mention that lacosamide is in phase 3 clinical development for the latter type of pain. The mechanism of action of lacosamide is to block the voltage-gated sodium channels (Beyreuther et al. 2007), which carry the inward membrane current necessary to generate an action potential in excitable cells (Rang et al. 2007). The excitability of the cells depends mainly on the availability of these channels for their activation. At the resting potential of the cell, the sodium channels are closed and can be opened via membrane depolarization thereby allowing an influx of sodium ions into the cell. Within milliseconds, the channels close and go into a fast inactivated state. Inactivation occurs until the membrane potential returns to its baseline. Drugs such as local anesthetics act by blocking the open channels whereas classical

anticonvulsants act by enhancing the fast inactivation of the channels. Conversely, lacosamide enhances a slow inactivation on a second-to-minute time scale of the voltage-gated sodium channels in a selective manner (Beyreuther et al. 2007). The enhancement of this slow inactivation leads to normalization of activation thresholds, consequently reducing hyperresponsiveness and thereby controlling neuronal hyperexcitability. Sodium channels identified as important players for signal transmission in nociception, Nav_{1.7}, Nav_{1.8}, and Nav_{1.9}, are expressed in peripheral sensory neurons (Dib-Hajj et al. 2010).

The first and last authors are familiar with the lacosamide drug and have published numerous studies on this drug over the past years (Stöhr et al. 2006, Beyreuther et al. 2006, Beyreuther et al. 2006, Beyreuther et al. 2007). In these studies, the authors also missed discussing the physiological action of the drug. One of their studies evaluated the effect of lacosamide on animal models of inflammatory pain and concluded that lacosamide displayed antihyperalgesic effects in various models of acute and chronic inflammatory pain and that it is currently under investigation in a more relevant animal disease model for arthritis (Stöhr et al. 2006). This statement suggests that the article criticized here is a continuation of their previous work.

The materials and methods section is well structured. The choice of the methods are appropriate for the objective of the study, although many details on the how the tests were performed are absent. The authors used some subjective statements such as “a substantial inflammation of joints was observed” or “a trial consisted of several applications”. These statements lack objectivity and needed further details. Furthermore, the choice of the injected volume in the joint seems high and unnecessary, and to my knowledge no recent studies have used that amount (50 μ l). Also, it is always useful to acknowledge the number of animals used in the study. In this study, they do not discuss the number, but with calculation of the different evaluations performed, the final count is of 140 animals for three end points.

2. Results and conclusions description

Histological analysis

The aim of doing a histological evaluation was to confirm the success of the induction of OA over time rather than looking at the potential effects of the treatment on the articular structures or to compare the pathology progression to pain behavior. The authors decided to use two different staining protocols (Hematoxylin & Eosin (H&E) and Safranin O-fast green (SOFG)), both being relevant to visualize specific structures. Hematoxylin & Eosin is commonly used to observe the cellularity whereas SOFG is used to detect areas of proteoglycan content reduction in cartilage.

Demonstrating the time course of histological changes of the rat femorotibial joints before and days 3 and 14 after MIA injection, Figure 1 shows the results obtained. The choice of non arthritic sections in both staining protocols is very poor, showing structural characteristics established to be related to OA (cartilage fibrillation on the femoral condyle, bone outgrowth and a reduction in intensity of SOFG staining which indicates a loss of proteoglycans in the matrix) (Guzman et al. 2003).

With the H&E staining an initial inflammatory response characterized by an expansion of the synovial membrane caused by edema fluid, fibrin and cell infiltration was observed at day 3. The authors claim that with the SOFG staining, at day 3 the articular cartilage is still intact. This is clearly not the case in their figure 1. The presence of clefts in cartilage on the femoral condyle and complete loss of proteoglycan staining can be observed. Janusz et al. (2001) demonstrated that 3 days after a 0.25mg MIA injection there is cartilage thickening and significant loss of proteoglycans from the superficial cartilage with fibrillation (Janusz et al. 2001). On day 14, proteoglycan loss was observed throughout the cartilage however the synovial membrane contained no inflammatory cells. These results are consistent with the literature, as the MIA model is described at that stage to be a model of pain and that inflammation has resolved (Schuelert and McDougall 2009).

But again, the authors' description of their results in figure 1 is incomplete; bone remodeling and the presence of angiogenesis are clearly visible.

In the presentation of their results in figure 1, it would have been of great interest to show the same tissue section of the animal's articulation at the same time point, as it is clearly not the case when looking at the H&E and SOFG stained sections. It would have revealed similar progression of degeneration, with the emphasis on different structures. Also it is not clear why the authors are changing the magnification of the microscopic sections. They should have the same magnification if they are showing the same characteristics, but if one shows synovial membrane and the other one shows collagen in the matrix, they may need different magnification to show them. But the authors are not consistent with the bar scale and the microscopic magnification. Sometimes the structures are bigger with a smaller magnification and vice versa. Furthermore, the authors fail to compare their results to the literature in the discussion.

Effect of drug treatment on secondary tactile allodynia and mechanical hyperalgesia

The authors have selected two different tests to evaluate the compound's efficacy. The fact that the authors have chosen the von Frey hair test and the Randall-Selitto devise, for secondary mechanical allodynia and hyperalgesia respectively, is relevant as these two tests were previously reported to produce a behavioral response associated with pain (Fernihough et al. 2004).

The authors reported the effect of drug treatment on secondary mechanical allodynia tested with von Frey filaments. The method reported however is of questionable validity. They have applied filaments ranging from 10g to 100g. The normal rats in their study have a paw withdrawal threshold of more than 80g. To my knowledge, this amount of paw pressure have not been reported in the literature elsewhere. Usually, normal rats are responding to stimulation of around 15-20g (Ferland et al. 2010) and it has been reported previously that hairs exerting a weight higher than 15g can lift the paw at the same time as

eliciting a response (Fernihough et al. 2004). This observation tends to diminish the reliability of the results described in the article, as they are not reproducible.

The results demonstrated that treatment with lacosamide (30mg/kg) and morphine (3mg) significantly improved the secondary mechanical allodynia of MIA-injected animals at days 3, 7 but not on day 14. In another study, the anticonvulsant gabapentin showed a complete absence of an acute effect on day 14, but a tendency for a gradual decrease of allodynia was observed later on day 18 (Vonsy et al. 2009). Although the study design was not the same, these results reflect the potential analgesic effect of gabapentin in the chronic phase of the MIA model, not evaluated in this study with lacosamide. Other studies have observed a biphasic time course of behavioral pain response in the MIA model (Ferland 2010, Vonsy 2009, Fernihough 2004, Bove 2003), with the basis of inflammation encountered only in the first week followed by the installation of a chronic pain state that is more related to nociceptive neuropathic than inflammatory pain.

Morphine given subcutaneously (SC) has been reported to reverse secondary mechanical allodynia in the MIA model (Vonsy et al. 2009, Pomonis et al. 2005, Fernihough et al. 2004). Morphine, acting on the μ opioid receptor is a classic drug treatment for moderate to severe pain states (Dworkin et al. 2010). The efficacy of morphine at all time points of this study provides evidence of the behavioral response related to pain, and validates the MIA model responses to lacosamide treatment. Moreover, it would have been of interest to demonstrate the potential analgesic effect of an established anticonvulsant drug in the MIA model as a further control for lacosamide such as gabapentin.

Furthermore, the results demonstrated that the NSAIDs diclofenac had no effect at all time points tested on the mechanical allodynia. In the literature, acute administrations of another NSAIDs in the MIA model, the selective COX-2 inhibitor celecoxib, was reported to be not effective on the pain response of the rats (Pomonis et al. 2005). Since patients with OA are treated with a prolonged administration of NSAIDs, it is not relevant to evaluate an acute administration. The chronic administration of celecoxib on a daily basis

resulted in a significant reversal of the pain response (Ferland et al. 2010, Pomonis et al. 2005). This is in contrast to the results obtained in this study where acute administration of the NSAIDs diclofenac did not have a significant effect on mechanical allodynia at day 3, 7 and 14.

With the Randall-Selitto paw pressure device, secondary mechanical hyperalgesia was shown by a reduction in the paw pressure withdrawal threshold. In their figure, the vehicle-treated animal results are not consistent with previous studies. The paw withdrawal threshold remains constant in time, which should not be the case in the MIA model. As stated above, the model encounters different pain mechanisms in its disease progression and hyperalgesia is an established mechanism of neuropathic pain, which in this model, occurs in the late phase. The authors reported a significant increase in paw pressure withdrawal threshold in the treated animals with lacosamide 3mg/kg at day 3, 7 and 14, whereas higher doses were effective at later time points, with lacosamide 10 mg/kg at day 7 only and lacosamide 30 mg/kg at days 7 and 14 in comparison to the vehicle treated animals ($P < 0.05$). The established treatments diclofenac 30mg/kg and morphine 3mg/kg reduced significantly the secondary mechanical hyperalgesia at all time points compared to the vehicle-treated animals ($P < 0.05$).

The study conducted by Fernihough et al. (2004) revealed that the potential analgesic effect of gabapentin in the MIA model was ineffective at reversing hyperalgesia tested with the Randall-Selitto test either at day 3, 14 or 28, however morphine did reversed hyperalgesia (Fernihough et al. 2004). In the same study, it is demonstrated that diclofenac reduced hyperalgesia at day 3 only following the MIA injection and suggested that the lack of diclofenac's effect at later days argues that non-inflammatory mechanisms are causing the pain behaviors at later time points in this model. In the article of interest for this critic, the authors discuss these findings by citing an erroneous statement. They misquoted the study of Fernihough et al., which reported that diclofenac had an effect on mechanical hyperalgesia at all time points tested. However, Fernihough et al. (2004) reported an effect only at day 3 post MIA injection.

In their discussion, the authors report that lacosamide seemed to be more potent in inhibiting secondary mechanical hyperalgesia than tactile allodynia. However, no explanation on this statement is discussed. Differences between secondary mechanical hyperalgesia and allodynia could be due to physiological differences between the two pain phenomena. Both are resulting from changes of signal processing in the central nervous system. Hyperalgesia is the result of a repetitive spinal activation of type C fibers releasing glutamate leading to sustained sensitization of nociceptive specific projecting neurons whereas allodynia implies the recruitment of non nociceptive myelinated type *AB fibers which innervate wide dynamic range neurons (Sandkühler 2009)*.

Later in the discussion they are reporting the effect of lacosamide in the inflammatory carrageenan rat model in a different study by the same authors (Stöhr 2006), and suggested that antinociception induced by lacosamide is mediated by interfering with pain transmission rather than by providing anti-inflammatory effects. The results here seem to be inconsistent with their hypothesis as lacosamide is effective at the earliest time point, when inflammation is more significant. The authors continued their discussion by citing the effect of lacosamide in other animal models of pain. But the parallel with the results observed in this study is not discussed. They seem to be promoting the effects of lacosamide while ignoring the pharmacological mechanism of action of the molecule.

In a parallel study with normal rats, the authors have tested the effect of lacosamide on normal animals to evaluate its possible autonomic influence. This is a positive point in their study, as it is of considerable importance to evaluate how the compound regulates organ functions. This process is parallel to the Phase 1 in human clinical trials. What is not clear though is the choice of the doses administered. The doses should have been the same as the ones used in the study. It appears that the authors have used this parallel study for another trial and are recycling the results. Treatments of lacosamide 8, 16 and 32mg/kg had no effect on pain parameters (they do not mention which pain parameters were evaluated) in comparison with vehicle rats (no *P* value). They also reported that diclofenac (30mg) had no effect on secondary mechanical allodynia at all time points tested (it is written $P < 0.05$ when it should have been $P > 0.05$).

In general, the article seems to draw a rapid conclusion on the positive efficacy of lacosamide for the treatment of pain related to OA. In the competing interests section, it is stated that BKB and TS are employees of Schwarz BioSciences GmbH, which is developing lacosamide for diabetic neuropathic pain and epilepsy treatments. Subsequently, it is stated that both authors are holders of patents, without mentioning which patents. In another article by TS (Stöhr 2006), it is declared that he owns shares of Schwarz Pharma. This is a major conflict of interest and possibly explains the reason why they are so enthusiastic in concluding that the treatment is effective, even suggesting that lacosamide should be evaluated for the treatment of OA pain in controlled clinical trials.

3. Research project proposal

Lacosamide was only tested at day 3, 7, and 14 post OA induction. It is said that the onset of OA in the MIA model is represented by the early/inflammatory stage at day 3, the established stage at day 14 and the late/chronic stage at day 28 (Fernihough et al. 2004). With the choice of their time points evaluated, the authors have omitted to evaluate all of the accepted stages of the model, missing relevant information on the treatment tested. Moreover, the late onset of the second phase of pain behavior, beginning 14 days after the MIA injection (Pomonis et al. 2005), suggests that analgesic agents evaluation would be more clinically relevant at later time points as in humans, OA is usually diagnosed when there is significant disease progression associated with joint malfunction and pain (Hunter et al. 2008). In a future study, the effects of lacosamide in the MIA model could be evaluated for a longer period of time. Lacosamide could be evaluated starting at day 14, when the pain state is said to be established in this model causing severe end-stage OA in the rat (Bove et al. 2003, Guingamp et al. 1997). The drug could be given on a daily administration. In their study, the authors have omitted to discuss the possible effects of the drug due to regular treatment. Some long lasting drug treatments are associated with a tolerance effect of the drug, reducing considerably the desired drug effect. Furthermore, it would be of interest to carefully evaluate the possible side effects of the drug since it has been reported that the margin between desired anticonvulsant effects and side effects such as loss of motor coordination is narrow (Rang et al. 2007). In a group of non injured animals, the effects of a daily administration of lacosamide on locomotor behavior could be studied with the use of a Rotarod, which is a rotating cylinder apparatus. Briefly, the animals would walk at a given cadence increasing with time on the rotating cylinder. With the Rotarod, it is easy to objectively measure the motor coordination of the rats (in-house observation). The animals would have three trials per day, after the oral administration of the drug. A mean of the trials would be compared to a baseline value obtained prior to lacosamide treatment.

Although the choice of the behavioral tests was adequate for their study, other tests could reveal further relevant information. Since joint pain typically worsens with weight

bearing and activity, it would be interesting to investigate the effect of lacosamide on animals in movement. In humans with knee OA, the temporal (velocity, cadence) and distance (stride length) gait factors are frequently reduced accompanied by a reduction of other kinetic and kinematic variables (flexion-extension of the joint, peak vertical ground-reaction forces and loading rates) (Andriacchi et al. 2004, Gök et al. 2002). These observations are of great interest for therapeutic drug studies as they reveal the real daily constraint of people living with OA. Several methods are commonly used in rodent studies to evaluate the gait disturbances such as the CatWalk which allows fast and objective results (Ferland et al. 2010, Gabriel et al. 2008). Gait analysis ranges from simply observing an animal's gait, as with the use of the CatWalk, to using a computerized three-dimensional motion analysis, if the budget allows. With the use of the CatWalk, lacosamide could be evaluated for its potent effect on reducing some gait disturbances observed in the animal's gait. The hypothesis would be that lacosamide is effective in decreasing the difference between the ipsilateral and contralateral hind limbs in gait parameters. The decreased difference will be observed as the marked limping gait due to an unwillingness of the animals to bear weight on the ipsilateral limb, also observed in human OA compensatory gait mechanics (McGibbon and Krebs 2002), will diminish. When the results are demonstrated to be significantly alleviating pain during motion, the second part of the study will take place.

The proposed project will also evaluate whether the increase in loading that occurs as a result of the relief of joint pain from the drug treatment accelerates the progression of OA. Previous studies conducted on rat models have demonstrated the effects of forced mobilization after OA induction on the pathogenesis (Appleton et al. 2006, Galois et al. 2004) but none has evaluated the effects of joint mobilization after analgesic treatment and the articular structural consequences. Pain is a physiological protective mechanism causing compensatory changes in movement to counteract potentially harmful mechanical loads during locomotion (Henriksen et al. 2006). Pain relief therapies are commonly used, but it is not clear if a long term treatment might have negative effects on the joint structures by enabling people with OA to consequently increase their daily rate of joint activity. To do

so, other animals will be evaluated. Fourteen days after the OA induction, the behavioral study will start. All animals will receive an oral dose of lacosamide (the dose that was significantly effective in the previous study) everyday prior to the behavioral tests. On a daily basis, animals will have to walk for a given period of time on a treadmill apparatus. On the treadmill, the walking cadence will be established with an imposed speed to normalize the data collection. A group will be declared control and will not be exercising (sedentary), a second group will be doing an exercise of slight training load, a third group will be exercising to a moderate training load and a fourth group will exercise to an intense training load once a day 5 days a week for the complete duration of the study. Rats will be walking instead of running since humans with OA will probably not start running even though they are free of joint pain, since most of OA suffering people are elderly. Another group of rats will be used as a non treated animal group and will not be exercising. This group will allow the histological comparison of the structural changes observed between treated versus non treated animals and between treated sedentary animals versus non-treated sedentary animals. The hypothesis will be that physical activity associated with load bearing on the affected joint will accelerate the progression of OA. In studies conducted on humans, it was concluded that the effects of pain relief of an established analgesic increased the joint loading, resulting in a facilitation of the progression of the disease (Henriksen et al. 2006) and exercising may result in maladaptive enlargement of subchondral bone, suggesting that increased daily rate of joint activity may have negative effects on the knee joint (Foley et al. 2006).

After the 14 days of the training period, the animals will be euthanized and the knee joints will be collected and dissected free of muscle for macroscopic and microscopic evaluations. These evaluations will allow a comparison of the structural differences between sedentary and active animals. Half of the joints collected will be processed for histological evaluation. Briefly, the joints will be embedded in paraffin, stained and cut into coronal sections to visualize the global articulation. A modified Mankin score system will be established to quantify the structural changes (Mankin et al. 1971). It has been reported that in the MIA model histological changes such as loss of articular cartilage and

subchondral bone lesions mimic those of human OA (Guzman et al. 2003) and this chronic joint degeneration is associated with chronic pain behavior (Vermeirsch et al. 2007). With the in-house observation of the histological changes occurring 28 days after the intra-articular injection of MIA, complete erosion of the hyaline cartilage on both the femoral and tibial surfaces was observed. Additionally, a remodeling of the subchondral bone was evident with the presence of osteophytes (Ferland et al. 2010), suggesting that at this endpoint the structural changes are mainly in the bone structure. Guzman et al. (2003) also reported bone changes at 28 days post injection with focal compression and fragmentation of the subchondral bone accompanied with replacement of bone and marrow elements by mature dense fibrous tissue (Guzman et al. 2003). Therefore, at the end of the experiment, scan images of knee joints of animals belonging to the different groups will be used to measure the degree of bone destruction. The imaging modality will be taken by an analysis of μ -computed tomography (μ CT) for a macroscopic observation. This technique is reported to be an effective one for the evaluation of osseous abnormalities in the rat (Kameoka et al. 2009). Several bone parameters will be analyzed such as the bone volume, the trabecular number and the thickness of the bone (Vermeirsch et al. 2007). It will be interesting to compare joints of non treated and treated sedentary animals to the active ones. The hypothesis will be that the bone structure of the active-treated animals is not prevailed from more damages than the non treated or treated sedentary animals. The hypothesis will be that activity results in more damage to the joint than inactivity. The macroscopic observation will support the hypothesis. Morenko et al. (2009) reported that at 28 days post MIA injection in the rat knee joint, μ CT images showed mild sclerosis of the tibial subchondral bone, in addition to mild changes to the tibial surface contour, although in the authors fail to report the MIA injected dose (Morenko et al. 2009). However, greater changes are expected in the trained animals, specially in the intense training load group.

Using the same animals, another objective could be investigated. Since lacosamide has only been tested for pain relief treatment, the potential effect of lacosamide as a disease modifying drug could be evaluated. With the knee joint sections and the scan images of non treated and treated animals, the difference between various structural changes could be

evaluated. Obviously, it would only be possible to evaluate one time point due to the euthanasia performed for knee joint collection. However, if there is any indication of a structural benefit of lacosamide administration, a future study using other animals could be conducted. Animals treated with a daily administration of lacosamide will be sacrificed at various time points and knee joints will be collected for macroscopic and microscopic evaluations of the early and late events of the pathology in the MIA model. The potential chondroprotective effect of lacosamide on the articular cartilage, but also its effect to block or reduce bone changes will be evaluated with a scoring system.

4. References

Andriacchi TP et al., A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Ann Biomed Eng.* 2004 Mar;32(3):447-57. Review.

Appleton CT et al., Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):R13.

Bendele A et al., Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol* 1999; 27:134-42.

Beyreuther B et al., Lacosamide displays antinociceptive effects in rat models for arthritis pain. Abstract 626, *J of Pain* 2006; 7:4:S14.

Beyreuther B et al., Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol.* 2006 ; 6;539(1-2):64-70.

Beyreuther B et al., Lacosamide: A review of preclinical properties. *CNS Drug Rev.* 2007 Spring;13(1):21-42. Review.

Bove S et al., New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev.* 2009 Apr;60(1):187-201.

Bove S et al., Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11: 821-30.

Chen YF et al., Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2008 Apr;12(11):1-278, iii.

Combe R et al., The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis : a model of chronic nociceptive pain in rats ? *Neurosci Lett.* 2004 Nov 11;370(2-3):236-40.

Dib-Hajj SD et al., Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci.* 2010 Apr 1. [Epub ahead of print]

Dworkin RH et al., Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(3)(suppl):S3-S14.

Ferland CE et al., Gait analysis and pain behaviour in two rodent models of oseoarthritis. (Article in preparation)

Fernihough J et al., Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112 (2004) 83-93.

Foley S et al., Physical activity and knee structural change: a longitudinal study using MRI. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Mar;39(3):426-34.

Gabriel AF et al., The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods* 2007;163:9–16.

Galois L et al., Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* 2004 Oct;12(10):779-86.

Gök H, Ergin S, Yavuzer G., Kinetic and kinematic characteristics of gait in patients with médial knee arthrosis. *Acta Orthop Scand* 2002 ;73 (6) :647-652.

Guingamp C et al., Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis : A dose-response study of loss of mobility, morphology and biochemistry. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1670-9.

Guzman RE et al., Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints : An animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol.* 2003 Nov-Dec;31(6):619-24.

Henriksen M et al., Increased joint loads during walking--a consequence of pain relief in knee osteoarthritis. *Knee.* 2006 Dec;13(6):445-50.

Hellio Le Graverand-Gastineau MP., OA clinical trials: Current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis Cartilage.* 2009 Nov;17(11):1393-401.

Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ., The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008 Aug;34(3):623-43. Review.

Janusz MJ et al., Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001 Nov;9(8):751-60.

Kameoka S et al., Diagnostic accuracy of microcomputed tomography for osseous abnormalities in the rat temporomandibular joint condyle. *Dentomaxillofac Radiol.* 2009 Oct;38(7):465-9.

Kidd B., Pathogenesis of joint pain in osteoarthritis, in *Osteoarthritis, Second Edition*, 2003, Oxford Press

Mankin H et al., Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53:523-537.

Marchand S. Neurophysiologie de la douleur, Chapitre 1 de Pharmacologie de la douleur. Sous la direction de P.Beaulieu, Les Presses de l'Université de Montréal, 2005.

McGibbon CA, Krebs DE. Compensatory gait mechanics in patients with unilateral knee arthritis. *J Rheum* 2002;29 :11.

Morenko BJ et al., In vivo micro computed tomography of subchondral bone in the rat after intra-articular administration of monosodium iodoacetate. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2004 Jan;43(1):39-43.

Pomonis JD et al., Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*. 2005 Apr;114(3):339-46.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Flower RJ. Rang and Dale's Pharmacology. Sixth Edition, 2007, Elsevier Limited.

Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*. 2009 Apr;89(2):707-58. Review.

Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(177):3-28.

Schaible HG et al., Mechanisms of pain in arthritis. *Ann NY Acad Sci*. 2002 Jun;966:343-54. Review.

Schuelert N and McDougall JJ. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett*. 2009 Nov 13;465(2):184-8.

Stöhr T et al., Lacosamide displays potent antinociceptive effects in animal models for inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2006 Apr;10(3):241-9.

Vermeirsch H. et al., Evaluation of pain behavior and bone destruction in two arthritic models of guinea pig and rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 Aug-Sep;87(3):349-59.

Vonsy JL et al., Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. *Eur J Pain*. 2009 Sep;13(8):786-93.

Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis-An untreatable disease ? *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr;4(4):331-44. Review.

ANNEXE III

Catherine Ferland

Curriculum vitae

Expériences académiques:

- | | |
|--------------------------|---|
| Sept. 2008-
Juin 2011 | <p>Ph.D. Sciences vétérinaires
 Université de Montréal – Faculté de médecine vétérinaire
 Département de Biomédecine
 Sujet: Caractérisation d'un modèle animal de douleur articulaire associée à l'arthrose du genou chez le rat Sprague-Dawley
 Directeur : Dr Pascal Vachon, Co-Directrice : Dre Sheila Laverty</p> |
| Sept. 2007-
Août 2008 | <p>M.Sc. Biomédecine avec passage accéléré au doctorat
 Université de Montréal – Faculté de médecine vétérinaire
 Département de Biomédecine
 Directrice : Dre Sheila Laverty, Co-Directeur : Dr Pascal Vachon</p> |
| 2004- 2007 | <p>B.Sc. Kinésiologie
 Université du Québec à Montréal – Faculté des sciences
 Département de Kinanthropologie</p> |

Bourses:

- | | |
|------|---|
| 2009 | <p>Réseau Canadien de l'Arthrite (CAN)/ The Arthritis Society (TAS)
 Graduate training award – Ph.D. Student</p> <p>Université de Montréal
 Bourse facultaire d'excellence au doctorat</p> |
| 2008 | <p>Université de Montréal
 Bourse pour le passage accéléré de la maîtrise au doctorat</p> <p>Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC)
 Bourse d'études supérieures du Canada Frederick Banting et Charles Best
 Bourse à la maîtrise</p> <p>Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ)
 Bourse de formation en recherche en santé - Maîtrise</p> <p>Université de Montréal
 Bourse d'admission à la maîtrise</p> <p>Vétoquinol N.- A. Inc.
 Bourse décernée pour des études dans le domaine de la gériatrie</p> <p>Université de Montréal
 Bourse Jos Rhéaume décernée pour un stage à l'étranger (Allemagne)</p> |

2007

Réseau Canadien de l'Arthrite (CAN)
Graduate training award – Master Student

Conseil de Recherche en Sciences naturelles et en Génie du Canada (CRSNG)
Bourse de recherche de premier cycle

Articles publiés:

Ferland CE, 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* (In Press), **2011**

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Gait analysis and pain behaviour of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 97: 603–610, **2011**

Beaudry F, **Ferland CE**, Vachon P. Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr. Sep*; 23(9):940-50, **2009**

Ferland C, Veilleux-Lemieux D, Vachon P. Effects of buprenorphine on an induced intracerebral hematoma rat model. *J Am Ass Lab Anim Sci. May*; 46(3):13-6, **2007**

Lema PP, Savard C, **Ferland C**, Vachon P. Modèle murin d'hémorragie intracérébrale induite par une injection sous corticale de collagénase. *Sci Tech Anim Lab. Vol. 31, N° 3/4*, **2006**

Article soumis :

Ferland CE, Beaudry F, Vachon P. Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. **2011**

Résumés publiés:

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Eugenol a potent treatment for osteoarthritis evaluated in a rat model of knee cartilage degeneration. **2010** Abstracts of the 13th World Congress on Pain, International Association for the Study of Pain (IASP), 29 August - 2 September 2010, Montreal, Canada [CD-ROM]. International Association for the Study of Pain/IASP Press, Poster No. PT 252

Ferland CE, Vachon P, Beaudry F. Identification, characterization and quantification of neuropeptides by HPLC/ESI/MS/MS in rat models of osteoarthritis. 58th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, USA, May **2010**, Poster No.188

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Gait analysis and pain behaviour of two rodent models of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, Volume 17, Supplement 1, September **2009**, Pages S56-S57

Présentations orales à titre de conférencier invité :

Ferland CE, Beaudry F, Vachon P. Évaluation des effets analgésiques de l'eugénol chez un modèle murin d'arthrose. Colloque intitulé "Et si on arrivait à soulager la douleur!", 79^{ième} Congrès Annuel de l'Association Francophone pour le Savoir (ACFAS). Sherbrooke, Canada, **2011**

Ferland CE. Evaluation of novel therapeutics : coupling of behavioral and molecular assesement of eugenol's effects in a rat model of osteoarthritis. Canadian Arthritis Network Annual Scientific Conference (CAN-ASC), Lac Leamy, Canada, **2010**

Ferland CE. Biomechanics of Gait. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Höchst, Germany, **2008**

Présentations orales lors de congrès :

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Évaluation de l'eugénol comme traitement de la douleur reliée à l'arthrose du genou. 78^{ième} Congrès Annuel de l'Association Francophone pour le Savoir (ACFAS). Montréal, Canada, **2010**

Ferland CE, Laverty S, Vachon P. Évaluation du patron de la démarche et de la réponse douloureuse chez deux modèles murins d'ostéoarthrose. Journée de la Recherche, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada, **2009**

Présentations par affiche :

Ferland CE, Laverty S, Vachon P. Evaluation of eugenol as a treatment for osteoarthritis related pain in a rodent model. 15th Annual McGill Pain Day. The Alan Edwards Centre for Research on Pain, Montreal, Canada, **2011**

Ferland CE, Vachon P, Beaudry F. Identification, characterization and quantification of neuropeptides by HPLC/ESI/MS/MS in rat models of osteoarthritis. Canadian Arthritis Network Annual Scientific Conference (CAN-ASC), Lac Leamy, Canada, Octobre **2010**

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Eugenol a potent treatment for osteoarthritis evaluated in a rat model of knee cartilage degeneration. International Association of Pain Study (IASP) 13th World Congress of Pain. Montreal, Canada, August **2010**

Ferland CE, Vachon P, Beaudry F. Identification, characterization and quantification of neuropeptides by HPLC/ESI/MS/MS in rat models of osteoarthritis. 58th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, USA, May **2010**

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Preliminary results of the evaluation of eugenol as a treatment for osteoarthritis related pain in a rodent model. Canadian Arthritis Network Annual Scientific Conference (CAN-ASC), Vancouver, Canada, November **2009**

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Gait analysis and pain behaviour of two rodent models of osteoarthritis. Segal North American Osteoarthritis Workshop (SNOW), Chicago, IL, USA, October **2009**

Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Gait analysis and pain behaviour of two rodent models of osteoarthritis. World Congress of Osteoarthritis – OARSI, Montréal, Canada, September **2009**

Ferland CE, Laverty S, Vachon P. Gait analysis and pain behaviour in two rodent models of osteoarthritis. 13th Annual McGill Pain Day. The Alan Edwards Centre for Research on Pain, Montreal, Canada, **2009**

Ferland C, Laverty S, Vachon P. Gait analysis and pain behaviour in two rodent models of osteoarthritis. Canadian Arthritis Network Annual Scientific Conference (CAN-ASC), Toronto, Canada, **2008**

Veilleux-Lemieux D, **Ferland C**, Vachon P. Effects of buprenorphine on an induced intracerebral hematoma rat model. Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FESALA), Cernobbio, Italy, **2007**

Expériences professionnelles lors de la formation aux études supérieures:

- 2008 **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH** (Frankfort, Allemagne)
Stage en industrie pharmaceutique d'une durée de huit semaines sous la supervision des Drs Martin Michaelis et Karl Rudolphi.
Sujet : Recherche et Développement dans les domaines de la douleur et de l'arthrose
- 2008-2010 **Université de Montréal – Faculté de médecine vétérinaire**
Auxiliaire d'enseignement