

Université de Montréal

**Métriologie de la douleur animale : Validation de méthodes
sur un modèle arthrosique chez le rat**

par
Julie Gervais

Département de biomédecine vétérinaire, Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pharmacologie

Décembre, 2013

© Julie Gervais, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Métrologie de la douleur animale : Validation de méthodes
sur un modèle arthrosique chez le rat**

présenté par :

Julie Gervais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Francis BEAUDRY, président-rapporteur

Pr Éric TRONCY, directeur de recherche

Dr Jean-Paul DESCÔTEAUX, membre du jury

Résumé

Les modèles animaux d'arthrose sont utilisés sur le rat depuis des décennies pour évaluer l'efficacité analgésique de nombreux composés. Cependant, la méthodologie utilisée, en particulier les protocoles d'évaluation de la douleur, est très différente d'une étude à une autre, rendant difficile la comparaison entre chaque projet. Afin d'améliorer le transfert des résultats précliniques vers la recherche clinique, ce projet propose d'établir un protocole d'évaluation de la douleur fiable et pertinent, et de le valider à l'aide du modèle d'arthrose expérimental le plus populaire, soit l'injection intra-articulaire de mono-iodoacétate de sodium (MIA). La répétabilité et la fiabilité inter-évaluateur de diverses méthodes d'évaluation de la douleur ont été évaluées, et le protocole d'acclimatation le plus fiable a été déterminé. Ensuite, les méthodes les plus intéressantes ont été testées pour leur sensibilité à détecter les altérations douloureuses induites par l'injection de MIA, ainsi que leur réponse au traitement analgésique, soit une injection intra-articulaire de lidocaïne. Une période d'acclimatation adéquate associée à un protocole d'évaluation combinant des mesures réflexes, des comportements spontanés ainsi que des tests opérants ont témoigné avec succès des changements douloureux liés à l'injection de MIA. Le test opérant fut la méthode la plus sensible pour détecter l'effet analgésique de la lidocaïne. Cette étude a permis d'établir le protocole d'acclimatation et les méthodes de l'évaluation de la douleur les plus fiables et sensibles. Aussi, il a démontré la pertinence du test opérant pour détecter la composante affective de la douleur chez les rongeurs.

Mots-clés : Modèle animal, Arthrose, Test opérant, Mono-iodoacétate de sodium, Validation, Acclimatation, Métrologie de la douleur.

Abstract

Animal models of osteoarthritis pain have been used for decades in rats to test the analgesia response of numerous compounds. Study methodology, in particular the pain assessment methods, is quite variable, making the comparison between each project difficult and sometimes simply impossible. In order to improve the translation of new therapies from the preclinical research to the clinical field, this study proposed to establish the reliability and concurrent validity of a panel of pain assessment methods. The concurrent validation was performed in the most popular osteoarthritis rat model, *i.e.* using the intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA). The repeatability and inter-observer reliability of various pain assessment methods were evaluated, and the most reliable acclimatization protocol was determined. Then, the most reliable methods were tested comparatively in the rat MIA osteoarthritis model for their sensitivity in detecting painful changes related to the MIA injection. Their responsiveness to treatment, *i.e.* an intra-articular injection of lidocaine, was also assessed. A complete pain evaluation protocol and reliable acclimatization period, combining reflexive and spontaneous behavior measures as well as operant testing, successfully demonstrated the pain related changes of the MIA injection. Operant testing was the most responsive to the analgesic effect of lidocaine. This study established the most reliable and sensitive methods of pain assessment and optimized acclimatization protocol. Moreover it defined the operant testing as a highly relevant tool to demonstrate the affective component of pain in rodent.

Keywords: Animal model, Osteoarthritis, Operant testing, Monosodium iodoacetate, Validation, Acclimatization, Pain metrology.

Table des matières

| | |
|---|------|
| Résumé | iii |
| Abstract..... | iv |
| Liste des tableaux..... | vii |
| Liste des figures | ix |
| Liste des sigles et abréviations..... | xii |
| Remerciements..... | xvii |
| Introduction..... | 1 |
| Chapitre 1 : Recension de la littérature | 4 |
| 1.1 Définition de la douleur : | 4 |
| 1.2 Neuro-anatomie du système de transmission de la douleur | 4 |
| 1.2.2 Modulation de la douleur | 8 |
| 1.2.3 Système nerveux central | 12 |
| 1.3 Modèles de douleur chez le rat..... | 15 |
| 1.3.1 Douleur nociceptive | 16 |
| 1.3.2 Douleur inflammatoire..... | 18 |
| 1.3.3 Douleur neuropathique..... | 23 |
| 1.3.4 Douleur reliée à un état maladif | 25 |
| 1.4 Modèles d'arthrose chez le rat | 28 |
| 1.4.1 Chimique enzymatique | 28 |
| 1.4.2 Chirurgicaux | 33 |
| 1.4.3 Spontanés | 34 |
| 1.4.5 Hormonaux | 36 |
| 1.5 Modalités d'évaluation de la douleur | 37 |
| 1.5.1 Mesures réflexes | 37 |
| 1.5.2 Mesures innées/spontanées | 43 |
| 1.5.3 Tests opérants | 48 |
| Hypothèses et objectifs..... | 53 |
| Chapitre 2 : Article original de recherche | 56 |
| 2.1 Abstract..... | 57 |

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 2.2 | Keywords | 58 |
| 2.3 | Abbreviations | 58 |
| 2.4 | Introduction..... | 59 |
| 2.5 | Materials and Methods | 64 |
| 2.5.1 | Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats | 65 |
| 2.5.2 | Phase 2: Concurrent validity with the MIA model..... | 70 |
| 2.6 | Statistical Analysis | 73 |
| 2.6.1 | Phase 1 | 73 |
| 2.6.2 | Phase 2 | 74 |
| 2.7 | Results..... | 75 |
| 2.7.1 | Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats | 75 |
| 2.7.2 | Phase 2: Concurrent validity with the MIA model..... | 78 |
| 2.8 | Discussion | 80 |
| 2.9 | Acknowledgements | 89 |
| 2.10 | Conflict of interest statement | 89 |
| 2.11 | Figures | 89 |
| 2.12 | Tables..... | 95 |
| Chapitre 3 | : Discussion générale..... | 100 |
| 3.1 | Sommaire des résultats | 100 |
| 3.2 | Réponses aux objectifs et hypothèses..... | 105 |
| 3.3 | Implication des résultats obtenus dans le contexte actuel de développement de nouveaux analgésiques | 106 |
| 3.3.1 | Un déficit de translation du préclinique vers l'application clinique..... | 107 |
| 3.3.2 | Validité du modèle animal de douleur | 109 |
| 3.3.3 | Le défi des méthodes d'évaluation de la douleur | 114 |
| 3.4 | Limites et perspectives futures de ce projet | 117 |
| Conclusion | | 120 |
| Bibliographie | | 122 |
| Annexes | | 149 |

Liste des tableaux

Chapitre 2 : Article original de recherche

| | |
|---|----|
| Table I: Experimental design for the evaluation of the most efficient acclimatization protocol. | 95 |
| Table II: Test-retest reliability of the left hind paw (LHP) and right hind paw (RHP) before and after excluding the first week and the first two weeks of daily punctate tactile allodynia evaluation (PTAE) over 25 days of assessment (n=5 rats)..... | 96 |
| Table III: Test-retest reliability of the left hind paw (LHP) and right hind paw (RHP) before and after excluding the first week of daily static weight bearing (SWB) evaluation over 15 days of assessment (n=4 rats)..... | 97 |
| Table IV: Coefficient of variation (CV) in percentage for each outcome at initial assessment (day -14) and variation in CV* between three protocols of acclimatization for the different methods of pain assessment tested..... | 98 |
| Table V: Mean and standard deviation (SD) of the punctate tactile allodynia evaluation (PTAE) (g) by experimental group over days. | 99 |

Annexe

| | |
|---|-----|
| Table VI : Tableau récapitulatif des publications ayant démontrée la validité du modèle MIA | 149 |
|---|-----|

Liste des figures

Chapitre 1 : Recension de la littérature

| | |
|--|----|
| Figure 1: Fibres afférentes nociceptives..... | 6 |
| Figure 2: Hyperalgésie primaire..... | 9 |
| Figure 3 : Hyperalgésie centrale..... | 11 |
| Figure 4 : Les voies de la douleur..... | 14 |
| Figure 5 : Récepteurs opioïdes au site de la première synapse..... | 17 |
| Figure 6 : Cascade de dégradation de l'acide arachidonique..... | 19 |
| Figure 7 : Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens..... | 21 |
| Figure 8 : Catégories et fonctions des enzymes cyclooxygénases | 22 |
| Figure 9 : Neuroanatomie des voies nociceptives et cible thérapeutiques associées à l'arthrose | 27 |

Figure 10 : Dispositif permettant la détection de l'hyperalgésie par la technique de Randall-Selitto.39

Figure 11 : Détermination du seuil de retrait à l'aide de filaments de von Frey.....40

Figure 12 : Dispositif permettant de mesurer la distribution pondérale statique.....44

Figure 13 : Tapis roulant d'exercice pour rat.....46

Chapitre 2: Article original de recherche

Figure 1: Picture of a rat acclimatizing to the place escape/avoidance paradigm device.
.....90

Figure 2: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the treadmill, number of total crossings (TNTC) by periods of 5 minutes each91

Figure 3: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the place escape/avoidance paradigm (PEAP) percentage of time spent on the dark side by period for n=5 rats tested over 25 days92

Figure 4: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the percentage body weight (%BW) of the static weight bearing (SWB) for the right hind paw (RHP) on days 3, 7, 14 and 21 post intra-articular injection.....93

Figure 5: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the percentage of time spent on the dark side for the place escape/avoidance paradigm (PEAP) on days 3, 7, 14 and 21 after intra-articular monosodium iodoacetate (MIA) injection.....94

Liste des sigles et abréviations

ADJ: ajusté (*adjusted*)

AINS: anti-inflammatoire non stéroïdien

AIS: anti-inflammatoire stéroïdien

AMPA : récepteur à amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

Amy : Amygdale (*amygdala*)

ARN: acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BID: deux fois par jour (*bis in die*)

BW: poids corporel (*body weight*)

°C: degrés celcius

CCK : cholécystokinine

CGRP : peptide relié au gène calcitonine (*calcitonin gene related peptide*)

COX: cyclo-oxygénase

COX-1 : cyclo-oxygénase de type 1

COX-2 : cyclo-oxygénase de type 2

CV: coefficient de variation (*coefficient of variation*)

DRG : ganglion de la racine dorsale (*dorsal root ganglion*)

DWB: distribution pondérale dynamique (*dynamic weight bearing*)

g: gramme

GPCR : récepteur couplé à la protéine G (*G-protein coupled receptor*)

Hp : Hyppocampe (*hyppocampus*)

HPETE : acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque

ICC: corrélation intra-classe (*intraclass correlation coefficient*)

IL-1: interleukine 1

IP : intra-péritonéal

kg : kilogramme

km : kilomètre

LHP: membre postérieur gauche (*left hind paw*)

mg: milligramme

mGlur : récepteur du glutamate métabotrope

MHE: évaluation mécanique de l'hyperalgésie (*mechanical hyperalgesia evaluation*)

MIA: acétate de monosodium (*monosodium iodoacetate*)

MMP-3: metalloprotéinase matricielle de type 3

n: nombre d'animaux (*number of animal*)

NAc : noyau accumbens (*nucleus accumbens*)

NGF : facteur de croissance des nerfs (*nerve growth factor*)

NK-1 : récepteur de neurokinine de type 1

NK-2 : récepteur de neurokinine de type 2

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

NTC: nombre total de croisements (*number of total crossing*)

OA: ostéoarthrose (*osteoarthritis*)

PAG : substance grise périaqueducule (*periaqueductal gray*)

PEA: poly-éthylène-amine

PEAP: paradigme du comportement d'échappement / évitement (*place escape / avoidance paradigm*)

PG : prostaglandine

PGD₂ : prostaglandine D₂

PGE₂ : prostaglandine E₂

PGF₂ : prostaglandine F₂

PGF_{2α} : prostaglandine F_{2α}

PGG₂ : prostaglandine G₂

PGH₂ : prostaglandine H₂

PGI₂ : prostacycline I₂

PKA : protéine kinase A

PO: par la bouche (*per os*)

PTAE: évaluation ponctuelle de l'allodynie tactile (*punctate tactile allodynia evaluation*)

PWT: seuil de retrait de la patte (*paw withdrawal threshold*)

QST: test sensitive quantitative (*quantitative sensory testing*)

RHP: membre postérieur droit (*right hind paw*)

RPM: révolution par minute (*revolution per minute*)

RVM: Médulla rostro-ventromédiale (*rostral ventromedial medulla*)

SEM: erreur standard (*standard error of the mean*)

SC: sous-cutané

SD: écart type (*standard deviation*)

SNRI : inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (*serotonin noradrenalin reuptake inhibitor*)

SWB: distribution pondérale statique (*static weight bearing*)

TNF: facteur nécrotique tumoral (*tumor necrosis factor*)

TNTC: nombre total de croisement sur le tapis roulant (*treadmill number of total crossings*)

TRPV-1: récepteur vanilloïde de type 1 (*transient receptor potential vanilloïde type 1*)

TXA₂: thromboxane A₂

uL: microlitre

VIP : polypeptide intestinal vasoactif (*vasoactive intestinal polypeptide*)

w/v : poids / volume (*weight / volume*)

5-HT : sérotonine

*Sois sage, ô ma douleur, et tiens-toi plus
tranquille. C. Baudelaire*

Remerciements

D'abord, je dois remercier Dr Éric Troncy pour m'avoir proposé ce projet et m'avoir guidé et encadré tout au long de son déroulement.

Un merci tout spécial à Colombe, pour son appui inestimable dans toutes les phases de ce projet (et notamment pour sa grande maîtrise de Sigma Plot). Merci à Martin pour avoir eu la gentillesse de se pencher sur la lourde tâche de compiler la base de données et effectuer les analyses statistiques. Merci à Dominique pour son soutien technique. Ton sens de l'organisation et ton dévouement sont franchement impressionnants.

Merci à Julie-Anne, pour avoir passé plusieurs heures dans le noir avec les rats. Une expérience inoubliable! Merci à Catherine pour sa patience et son assiduité à faire les évaluations comportementales dans la bonne humeur.

Merci également à Simon pour avoir été si tolérant et disponible. Tes encouragements et ton support ont été bien appréciés. Merci à Janick pour avoir gentiment accepté de relire le texte. Ton œil de lynx fut bien utile.

Je veux également remercier ma famille et mes amis pour leur soutien inestimable. Une mention spéciale à mes parents Aline et Pierre, mon frère Éric et mon amoureux Maxime. Je vous aime tous beaucoup.

Introduction

De tous les temps, la douleur occupe une place importante dans le monde. Sa définition actuelle, telle qu'établie par *l'International association for the study of pain* se présente comme suit : L'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante, potentielle ou décrite en ces termes (Bogduk & Merskey, 1994). De base, la douleur se veut une expérience utile. En effet, l'objectif premier de la douleur consiste à servir de système d'alarme visant à protéger l'organisme d'un processus dommageable à son intégrité. La neuro-anatomie de la douleur est bâtie de sorte que nos réactions face à un processus douloureux nous amènent à en diminuer la cause et ainsi limiter les conséquences néfastes de ce processus.

Bien que fondamentalement utile la douleur demeure une expérience désagréable. A notre époque, nous sommes souvent amenés à vouloir la combattre le plus efficacement possible. Mais la douleur est en soi une entité extrêmement diversifiée. Ainsi, en connaissant l'origine, les mécanismes d'action et les modes de transduction, conduction, modulation (soit sa transmission) et perception de cette douleur, en arriverons-nous à soulager le plus efficacement possible ceux qui en souffrent.

La douleur chronique représente un défi en soi puisqu'en souffrir peut impliquer de voir sa qualité de vie et l'épanouissement de sa famille terriblement amputés, de même que son niveau d'activité et ses capacités personnelles au travail et aux loisirs. L'arthrose est une des maladies les plus étudiées à ce jour. Sa grande prévalence parmi les populations vieillissantes

(Breivik, Collett, Ventafridda, Cohen, & Gallacher, 2006; Centers for Disease & Prevention, 2013; Dieppe & Lohmander, 2005; Hinton, Moody, Davis, & Thomas, 2002; Lawrence et al., 2008) et sa tendance incapacitante relativement aux activités journalières des gens qui en sont atteints, sont des raisons expliquant pourquoi cette pathologie est la cible des chercheurs qui œuvrent dans le domaine des analgésiques. L'intérêt porté à cette maladie se comprend aisément quand on prend en compte le vieillissement accéléré des populations et l'augmentation quasi épidémique des cas d'obésité (deux facteurs de risques connus dans l'arthrose) (Hootman & Helmick, 2006), combinés au fait qu'aucun traitement curatif efficace n'ait été établi à ce jour.

Comme l'utilisation de sujet de recherche humain est éthiquement impensable (Mogil, 2009), la nécessité de recourir à des sujets animaux dans le processus initial de la recherche vient aussi compliquer notre capacité à évaluer la douleur et ses manifestations ainsi qu'à doser les effets d'éventuelles molécules analgésiques. L'aspect éthique d'une telle pratique n'est évidemment pas à négliger. En effet, il faut une excellente compréhension de l'espèce choisie, de son anatomie et de la transmission de ses influx nerveux ainsi qu'une bonne connaissance éthologique afin de mieux analyser les comportements exprimés. Reconnaître la douleur chez l'animal est une tâche complexe. Bien que certains comportements soient facilement reconnaissables lorsqu'extériorisés, l'absence de réaction ne doit pas toujours être interprétée comme une absence de douleur (Le Bars, Gozariu, & Cadden, 2001).

Le rat, depuis longtemps, est une espèce très prisée pour les études de douleur. De par sa petite taille, la facilité de le manipuler, de le garder en animalerie et d'effectuer divers tests et

procédures, ce rongeur occupe une grande place dans le domaine des modèles animaux de recherche sur la douleur. De plus, son intelligence et son système nociceptif similaire à celui de l'homme en font un animal utilisé dans les études nécessitant l'apprentissage ou l'interaction avec l'environnement. Le rat est l'espèce la plus représentée dans les études portant sur la douleur (Héon. L, 2005). Dans le contexte économique actuel, la possibilité d'utiliser un modèle de rongeur pertinent et reconnu pour la condition étudiée constitue un avantage certain.

Malgré les nouvelles connaissances sur les mécanismes de la douleur par l'utilisation de modèles animaux, il est clair que peu de nouveaux traitements ont vu le jour dans les dernières années chez l'humain (Dixon et al., 2013; Mogil & Crager, 2004). Plusieurs critiques ont d'ailleurs été lancées récemment sur le sujet par les membres de la communauté scientifique (Blackburn-Munro, 2004; Yezierski & Vierck, 2011).

Vue la grande complexité du phénomène de la douleur, tant au niveau de sa perception, de sa transmission et de son expression, il importe d'avoir des modèles animaux valables et pertinents et de savoir évaluer convenablement leur douleur de façon à faire avancer la recherche d'une cure pour soulager nos divers maux (Mao, 2009; Mogil, 2009; Yezierski & Vierck, 2011).

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1.1 Définition de la douleur :

Tel que présentée en introduction, la douleur se définit comme une combinaison de composante sensorielle et émotionnelle. En effet, la douleur a été décomposée en deux parties (ou composantes) principales : sensori-discriminative et émotivo-comportementale (ou affective-motivationale) (Fields, 1999). Ces composantes sont issues de la physiopathologie et de l'anatomie du système de transmission de la douleur (système nociceptif).

D'abord, il faut savoir que la nociception est le processus sensoriel de cheminement du signal issu de récepteurs périphériques (nocicepteurs) à travers le système nerveux (Marchand, 2005). Cette nociception sert donc de moyen d'alarme visant à protéger l'intégrité de l'organisme puisque suite à sa transduction, le signal nociceptif s'achemine vers le cortex pour y être intégré. On remarque aussi que la nociception est en fait une composante de la douleur qui elle, se définit plus comme une expérience désagréable.

1.2 Neuro-anatomie du système de transmission de la douleur

La perception de douleur ainsi que la réponse associée (qu'elle soit issue d'un phénomène réflexe ou d'une intégration émotive) nécessitent un système nerveux nociceptif fonctionnel. La transmission de la douleur et les différents moyens de contrôle reliés nécessitent une implication à la fois du système nerveux périphérique et du système nerveux central.

1.2.1 Système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique responsable de transmettre les influx nociceptifs est composé de terminaisons nerveuses libres reliées à des axones et fibres nerveuses myélinisées ou pas. On retrouve les terminaisons au niveau de la peau, des muscles, des articulations et sur les parois des viscères.

Les nocicepteurs périphériques sont constitués des terminaisons libres des fibres nerveuses nociceptives afférentes qui seront définies plus loin. Ces nocicepteurs sont activés par des stimuli mécaniques (ex. pression), thermiques et chimiques (ex : acidité). Plusieurs de ces nocicepteurs répondent aux stimuli de différentes catégories et sont donc classifiés de multimodaux. L'activation de ces nocicepteurs mène donc à la création d'un potentiel d'action (transduction du signal) qui est acheminé (conduction) vers les centres d'intégration du système nerveux central. (Argoff, 2011; Besson, 1999; Woolf, 2004)

Les fibres nerveuses nociceptives afférentes (figure 1) sont classées selon l'épaisseur de leur gaine de myéline soit C (pas myélinisées) et A δ (peu myélinisées). Ce sont les terminaisons libres de ces deux types de fibres qui composent principalement les nocicepteurs. Un autre type de fibre nerveuse afférente somatique est parfois liée à la nociception. En effet, les fibres A β (très myélinisées) ne sont pas impliquées dans le processus physiologique de douleur mais peuvent « être recrutées » dans les phases pathologiques (Marchand, 2005).

Principalement en raison de l'épaisseur de leur gaine de myéline, les fibres nerveuses nociceptives se caractérisent également par leur vitesse de transmission. Ainsi, les fibres C,

étant amyéliniques, ont des vitesses de conduction plutôt lente (0,5 à 2 m/sec) et sont de faible diamètre (0,2 à 1,5 μm). Les nocicepteurs associés aux fibres C sont multimodaux (Marchand, 2005).

Les fibres $A\delta$ sont des fibres myélinisées de petit diamètre (1 à 5 μm). Leur vitesse de conduction (5 à 30 m/sec) est plus grande que les fibres C. Les nocicepteurs associés aux fibres $A\delta$ sont principalement sensibles aux stimuli mécaniques nociceptifs. Des nocicepteurs multimodaux y sont cependant aussi associés (Marchand, 2005).

Les fibres $A\beta$ étant fortement myélinisées, sont considérées comme ayant le plus fort diamètre (6 à 12 μm) et les vitesses de conduction les plus rapides (35-75 m/sec). Comme discuté précédemment, dans des conditions physiologiques, les terminaisons libres de ces fibres ne se comportent pas comme des nocicepteurs, étant plutôt associées aux sensations de toucher léger. Cependant, dans certaines situations, elles peuvent jouer un rôle dans la modulation de la perception de la douleur (Marchand, 2005).

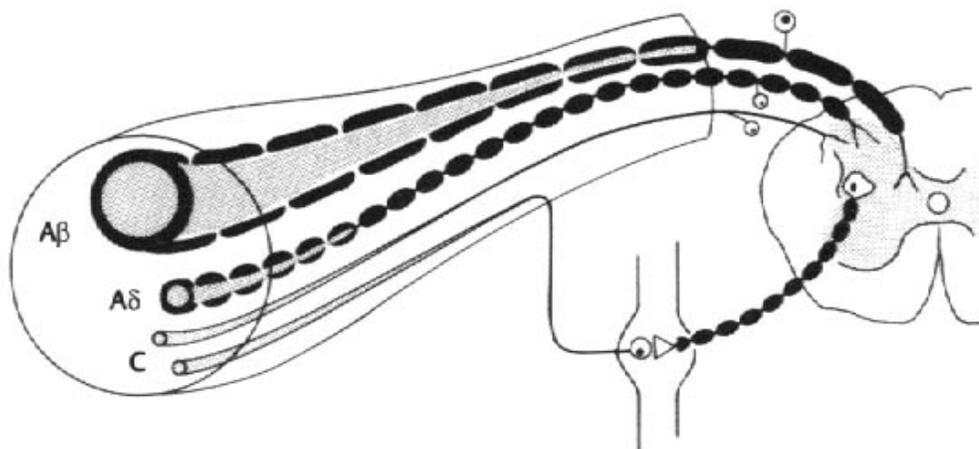


Figure 1 : *Représentation schématique des différents types de fibre afférente nociceptive. Les traits noirs représentent la gaine de myéline. Le diamètre de la fibre ainsi que l'épaisseur de la couche de myéline influencent la vitesse de transmission de l'influx nerveux (Field, 1989).*

Les nocicepteurs sont stimulés par différents processus directs, comme les stimulations mécaniques, thermiques et chimiques, mais aussi par différentes molécules dites algogènes libérées lors d'un dommage tissulaire. Il s'agit principalement de molécules pro-inflammatoires telles : l'histamine, la bradykinine, les prostaglandines, certaines interleukines, l'interféron, le facteur de nécrose tissulaire, la sérotonine et les ions hydrogènes. L'activation des nocicepteurs conduit à la création d'un potentiel d'action ou influx nerveux. Ces molécules pro-inflammatoires ne génèrent pas à proprement parler de potentiel d'action mais leur relâche tissulaire et leur action sur les nocicepteurs se traduisent par une diminution du seuil de déclenchement du potentiel d'action. On parle alors de sensibilisation périphérique.

Une fois activée, la fibre nerveuse dite afférente, va transmettre l'influx jusqu'à son corps cellulaire situé dans un ganglion spinal tout proche de la corne dorsale de la moelle épinière vers laquelle il se rend à l'aide d'une ramification, ou dendrite, et au niveau de laquelle il fait synapse avec un autre neurone. A cet endroit, l'activation du neurone produit la libération de neurotransmetteurs divers, ioniques ou de type neuropeptide telles la substance P, la somatostatine, la neurokinine A, etc., ou de type acide aminé excitateur tels le glutamate et l'aspartate. Cette libération se produit au niveau de l'espace inter synaptique avec les neurones nociceptifs spinaux (Argoff, 2011; Besson, 1999; Woolf, 2004).

1.2.2 Modulation de la douleur

La sensibilité des nocicepteurs périphériques peut parfois être modulée selon les situations. En effet, un phénomène de sensibilisation périphérique est possible (*cf.* ci-dessus). Ce phénomène implique l'action des molécules algogènes précédemment listées sur la sensibilité des nocicepteurs. Cette sensibilisation périphérique se traduit par l'apparition d'hyperalgésie et d'allodynie.

1.2.2.1 Hyperalgésie

L'hyperalgésie se définit comme une perception de douleur anormalement élevée associée à un stimulus nociceptif. En effet, au site d'une lésion, l'accumulation de molécules pro-inflammatoires et sensibilisatrices contribue à recruter et à maintenir les nocicepteurs périphériques avoisinants dans un état actif rendant la transduction d'une stimulation locale plus forte, ou intense, donc plus douloureuse, qu'en l'absence de ces médiateurs et sensibilisateurs. Cela correspond donc à l'hyperalgésie primaire (figure 2) (Julius & Basbaum, 2001; Loeser & Treede, 2008).

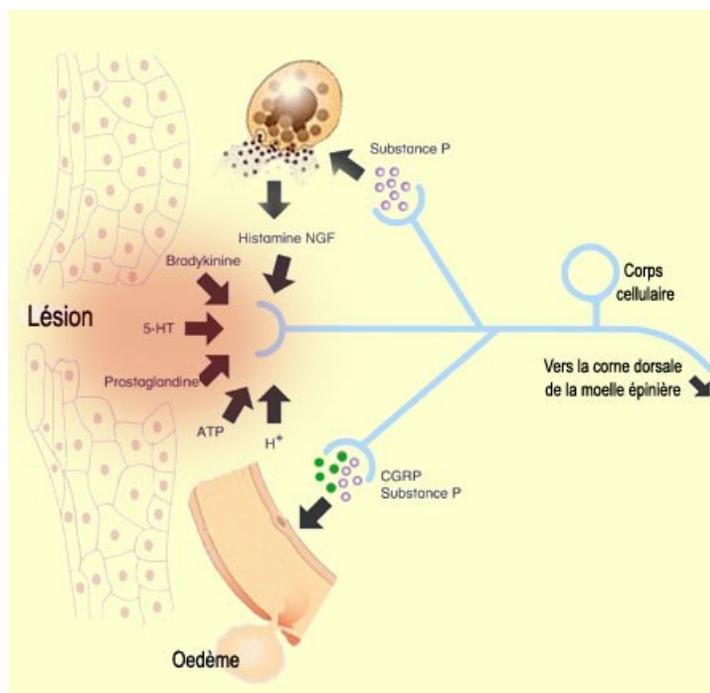


Figure 2 : Représentation schématique de l'hyperalgésie primaire. Suite à une lésion tissulaire, les molécules algogènes libérées vont sensibiliser les terminaisons libres (nocicepteurs) à proximité. 5-HT (sérotonine), ATP (adénosine triphosphate), CGRP (calcitonin gene related peptide), NGF (nerve growth factor) Source : *Le Cerveau à tous les niveaux* : http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_03/a_03_m/a_03_m_dou/a_03_m_dou.html, 07 février 2014

Le mécanisme d'action lié à l'apparition de l'hyperalgésie fait intervenir la sensibilisation à la fois des récepteurs périphériques au site de la lésion nociceptive et au site de synapse au niveau des neurones de la racine dorsale de la moelle épinière par le biais de l'activation des récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Dougherty & Willis, 1991; Haley, Ketchum, & Dickenson, 1990) et Neurokinine 1 (NK-1). On peut donc décrire l'hyperalgésie en terme

d'hyperalgésie primaire (soit provenant du site même original de stimulation nociceptive) ou secondaire (centrale).

L'hyperalgésie secondaire et/ou centrale (figure 3) se manifeste par un état d'hyperexcitabilité d'un neurone sensitif central au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. D'abord l'extension de la sensibilisation périphérique aux tissus avoisinants entraîne une hyperalgésie secondaire locale. Puis, l'activation intense et prolongée d'un nombre croissant de fibres afférentes (surtout de type C) se traduit par une libération massive de neurotransmetteurs spinaux tels glutamate, aspartate, substance P et neurokinine A au niveau de la première synapse, il y a ainsi une activation chronique des récepteurs post-synaptique NMDA et NK-1 se traduisant par une modification cellulaire du neurone post-synaptique, le rendant plus sensible aux neurotransmetteurs excitateurs. Ainsi, le processus nociceptif d'une durée et d'une intensité suffisante pour produire un influx nerveux prolongé à travers le récepteur NMDA et NK-1 va réussir à garder les neurones de la corne dorsale dans un état d'hyperexcitabilité créant ainsi l'hyperalgésie centrale (Traub, 1996).

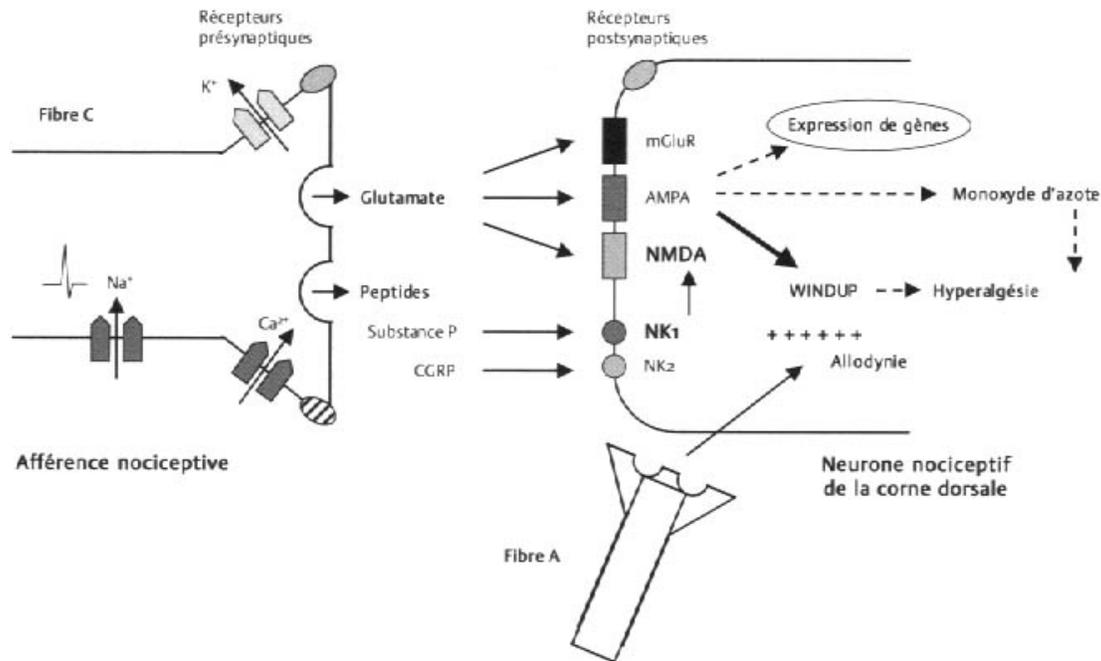


Figure 3 : Représentation schématique de l'hyperalgésie centrale. Suite à une stimulation intense et prolongée des neurones nociceptifs afférents, il y a libération et accumulation, dans la fente synaptique, de molécules excitatrices (glutamate, peptides, etc.) qui lient et activent les récepteurs post synaptiques NMDA et NK-1. L'activation de ces récepteurs induit des changements cellulaires qui contribuent à abaisser le seuil d'activation du neurone de la corne dorsale, le rendant ainsi hypersensible AMPA (récepteur à amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate, CGRP (calcitonine-gene related peptide), mGluR (récepteur du glutamate métabotropique, NK1 (neurokinine de type 1), NK2 (neurokinine de type 2), NMDA (N-méthyl-D-aspartate), (Beaulieu & Rice, 2003; Dickenson & Chapman, 1997).

1.2.2.2 Allodynie

L'allodynie se caractérise comme étant une perception de douleur causée par un stimulus normalement non-nociceptif. Elle peut être décrite comme étant tactile (pression statique), kinesthésique (ou tactile dynamique comme un frottement cutané) ou thermique. La distinction entre allodynie et hyperalgésie repose sur le fait que le stimulus déclenchant l'allodynie est reconnu dans les conditions « normales » comme étant incapable d'activer les nocicepteurs (Loeser & Treede, 2008; Sandkuhler, 2009). Elle fait aussi intervenir les fibres nerveuses de type peu myelinisé A δ et non myelinisé C (Bauer et al., 2009; Coutaux, Adam, Willer, & Le Bars, 2005). La physiopathologie de l'apparition de l'allodynie fait intervenir les mêmes composantes et modes d'actions que l'hyperalgésie (soupe inflammatoire et molécules sensibilisatrices) et compte aussi des phases de sensibilisation périphérique et centrale (Combe, Bramwell, & Field, 2004; Coutaux et al., 2005).

1.2.3 Système nerveux central

Suite à une première synapse au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, les neurones nociceptifs spinaux cheminent *via* des faisceaux spinothalamiques latéral et médian (ou réticulaire), jusqu'aux neurones thalamiques. Il est à noter que les neurones nociceptifs spinaux subissent une décussation ventrale au niveau de la moelle épinière. Ainsi, le cerveau droit analyse les signaux nociceptifs en provenance de la périphérie gauche, et vice-versa.

Le système nerveux central, qui comprend la moelle épinière et les centres supérieurs, est responsable de l'intégration (modulation et perception), de la discrimination et de la mémorisation de la douleur. De façon générale, le faisceau spinothalamique latéral est plus

impliqué dans l'intégration de la composante sensori-discriminative tandis que le faisceau médian (réticulaire) est plus impliqué dans la composante émotive-comportementale (Marchand, 2005).

Le thalamus est le siège d'une première synapse. Il agit entre-autre comme un centre de triage de l'information nociceptive. Comparativement au système nerveux périphérique, le système nerveux central décode donc les composantes émotionnelles, affectives et comportementales face aux stimuli douloureux. Ainsi, le thalamus envoie différents influx à travers l'hypothalamus, le cortex somesthésique et le système limbique (Rainville, Duncan, Price, Carrier, & Bushnell, 1997; Woolf & Salter, 2000).

Un système nociceptif fonctionnel (figure 4) est donc nécessaire à la perception de la douleur ainsi qu'à la réponse de l'organisme pour s'en prémunir et même à modifier certains comportements pour l'éviter.

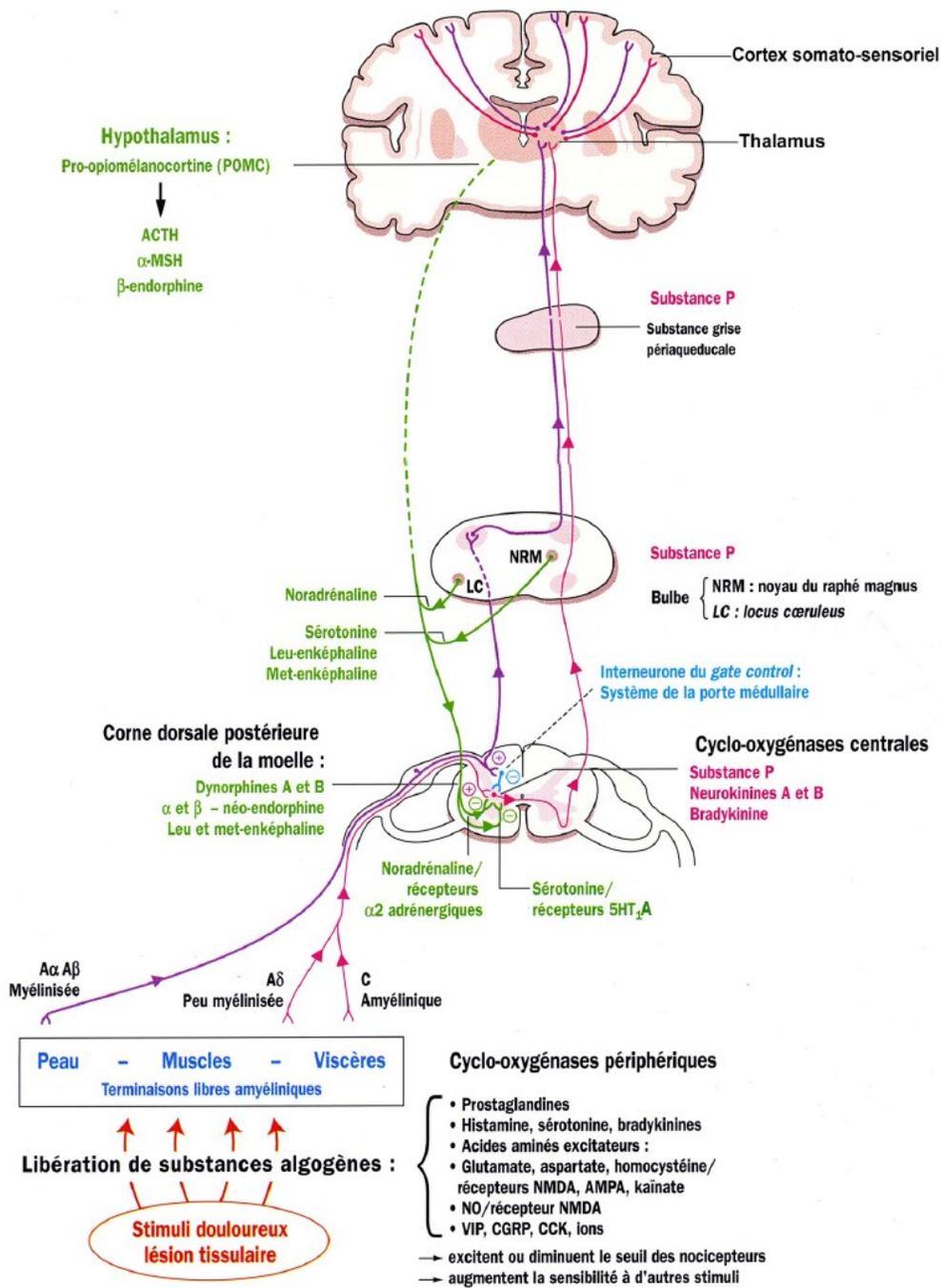


Figure 4 : Représentation graphique des voies de la douleur et molécules algogènes et analgésiques AMPA (récepteur à amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate, CCK (cholécystokinine), CGRP (calcitonin gene related peptide), NMDA (N-méthyl-D-aspartate), VIP (vasoactive intestinal polypeptide) (Giniès, 1999).

1.3 Modèles de douleur chez le rat

La nociception est la détection de stimuli potentiellement délétères conduisant à la perception d'une douleur. La douleur n'a pas seulement une composante sensorielle mais représente également une expérience émotionnelle. La plupart des travaux de recherche visant à étudier la douleur chez l'humain ont été conduits sur des modèles mammifères (Handwerker, Anton & Reeh, 1987). Ainsi, le rat, étant un mammifère, se qualifie pour un système nociceptif similaire à celui de l'homme. De plus, les mécanismes de nociception, nocicepteurs (transduction), fibres afférentes (conduction), et modulation décrits précédemment sont similaires d'une espèce à l'autre (Handwerker, Anton, & Reeh, 1987). La composante émotivo-comportementale de la douleur est aussi présente chez ce rongeur. Le rat se qualifie comme étant une espèce susceptible d'être utilisée comme modèle de nociception puisqu'il possède les critères suivants : la présence de nocicepteurs, de structures cérébrales (système nerveux central) susceptibles d'intégrer le message nociceptif, de voies d'acheminement des signaux nociceptifs de la périphérie vers le système nerveux central, de récepteurs opioïdes et de molécules opioïdes endogènes, une capacité à produire des comportements d'évitement et d'apprentissage face à la douleur, ainsi qu'une réponse nociceptive atténuée en présence d'analgésiques reconnus. De plus, la capacité à modifier son comportement normal face à un stimulus nociceptif souligne la possibilité d'une intégration (perception et modulation) de la douleur (Bateson, 1991; Sneddon, 2004).

Pour bien définir les différents modèles de douleur existants chez le rat, il importe d'abord de connaître les types de douleur rencontrés et « mesurables » chez cette espèce. En effet, il est

possible d'induire et de caractériser des douleurs de types nociceptive, inflammatoire, neuropathique ou idiopathique (Mogil, 2009).

En règle générale, les douleurs nociceptives ou inflammatoires ont tendance à être de courte durée ou ponctuelles alors que les douleurs neuropathiques ou idiopathiques sont plutôt de type chronique (Mogil, 2009).

1.3.1 Douleur nociceptive

La douleur nociceptive correspond au processus douloureux physiologique qui affecte un tissu corporel tel un muscle, un os, la peau ou les viscères. La sensation de douleur comme telle est acheminée par un influx nerveux du système périphérique au système nerveux central et fait intervenir une pléthore de récepteurs périphériques de différents types (pression, chaleur, froid, *etc.*) (Loeser & Treede, 2008; Mogil et al., 2006) Chez le rat, ce type de douleur est souvent recréé par application ponctuelle d'un stimulus douloureux (thermique, mécanique, chimique ou électrique) à une partie du corps facilement accessible (un membre, souvent postérieur), la queue ou l'abdomen, amenant une réponse de retrait de la douleur facilement mesurable ou quantifiable (Barrot, 2012; Loeser & Treede, 2008; Mogil et al., 2006).

La physiologie à l'origine de la douleur nociceptive se veut une application pure et simple du mécanisme neurologique de transmission et de perception de la douleur tel que décrit plus tôt. Les récepteurs membranaires des fibres nociceptives sont activés par la libération de substances algogènes et sensibilisatrices. L'influx nerveux ainsi créé est acheminé par les fibres nerveuses myélinisées ou pas. La fibre afférente fait synapse au niveau de la corne

dorsale de la moelle épinière. Une nouvelle synapse propulse l'influx aux voies ascendantes *via* le tractus spinothalamique ou spinoréticulaire puis, du thalamus au cortex sensoriel et au système limbique. Les processus inflammatoires ou les atteintes neurologiques ont souvent pour effet d'entretenir ou d'amplifier la sollicitation des récepteurs nociceptifs (Julius & Basbaum, 2001; Weiss & De Waard, 2006).

La douleur nociceptive est souvent traitée par l'utilisation d'opioïdes, des analgésiques d'action centrale. En effet, ceux-ci, par leur action sur les récepteurs opioïdes mu, kappa et delta au niveau pré- mais surtout post-synaptique, entraînent respectivement une diminution de la libération de neurotransmetteurs et une hyperpolarisation cellulaire, et « bloquent » ainsi les influx nerveux des fibres afférentes nociceptives et la transmission de l'influx nerveux de la périphérie vers le système nerveux central (figure 5) (Pasternak, 2012).

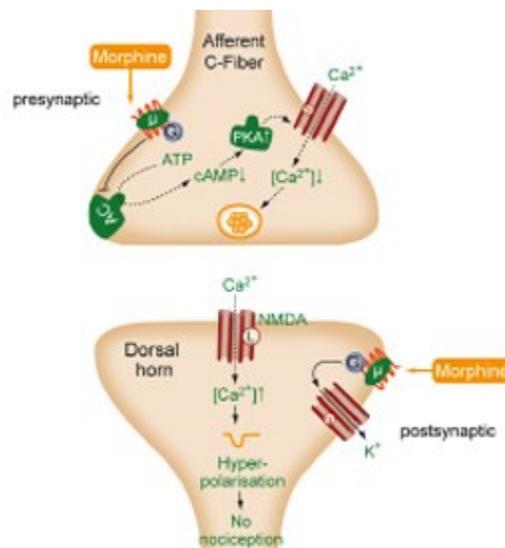


Figure 5 : Représentation schématique de la localisation et du mode d'action des récepteurs opioïdes au niveau de la première synapse. Les récepteurs opioïdes agissent au niveau pré-synaptique en bloquant la relâche de neurotransmetteurs excitateurs du neurone afférent. Au

niveau post-synaptique, les récepteurs opioïdes, lorsque activés vont créer une hyperpolarisation du neurone diminuant la possibilité de création d'un potentiel d'action.

(Figure présentée en anglais pour ne pas nuire à la qualité graphique) PKA (protéine kinase A), NMDA (N-méthyl-D-aspartate), ATP (adénosine triphosphate). Source : Change pain : <http://www.change-pain.com/grt-change-pain-portal/203600166.jsp>, 7 février 2014

1.3.2 Douleur inflammatoire

La douleur de sources inflammatoires fait intervenir, comme son nom l'indique, les molécules pro-inflammatoires (Tal, 1999; Woolf, 2004; Woolf & Salter, 2000). Certaines de ces molécules sont aussi algogènes ou sensibilisatrices, comme discuté précédemment. Ainsi l'inflammation d'un tissu implique une activation des récepteurs nociceptifs locaux. En effet, le développement d'inflammation au site d'une lésion provoque la libération de l'acide arachidonique qui sera ensuite dégradé par l'enzyme cyclooxygénase en différentes molécules, notamment les prostaglandines (figure 6). Plusieurs autres molécules sont aussi libérées lors d'un dommage inflammatoire et certaines d'entre-elles sont responsables de l'activation des nocicepteurs telle que vue à la figure 2. L'inflammation peut aussi se retrouver au niveau central et agir de la même façon (en augmentant la quantité de prostaglandine) pour mener à la perception accrue d'une sensation douloureuse (Yaksh, Dirig, & Malmberg, 1998).

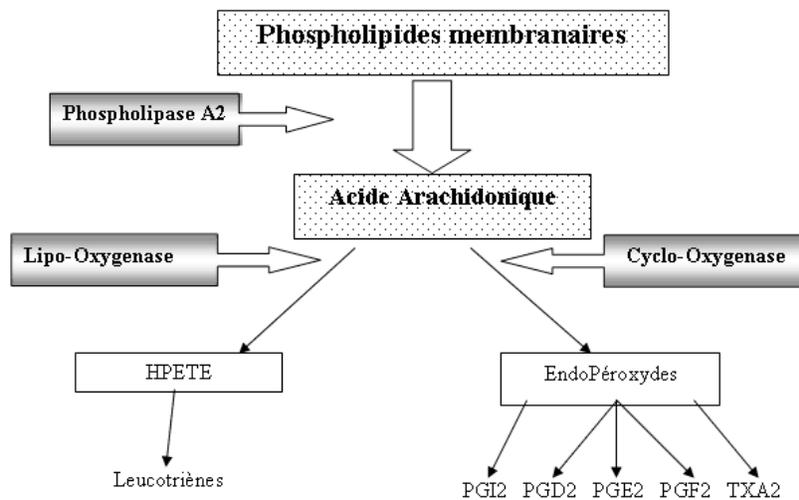


Figure 6 : Représentation schématique de la cascade de dégradation de l'acide arachidonique. HPETE (acide 5-hydroxyperoxyeicosatetraenoïque), PGI_2 (prostacycline I_2), PGD_2 (prostaglandine D_2), PGE_2 (prostaglandine E_2), PGF_2 (prostaglandine F_2), TXA_2 (thromboxane A_2) Source : Faculté de médecine de Toulouse, Deuxième cycle des études en médecine, Réaction inflammatoire : Aspects biologiques et cliniques, conduite à tenir : <http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item112/index11.htm>, 10 février 2014.

Ce type de douleur est souvent utilisé dans le cadre des études de douleurs chroniques pour évaluer la douleur arthritique ou arthrosique (Mogil, 2009). Ainsi, chez les rongeurs, plusieurs modèles de douleur inflammatoire sont développés pour représenter les polyarthrites (injection dans la queue de l'adjuvant complet de Freud) (Butler, Godefroy, Besson, & Weil-Fugazza, 1992) ou les mono-arthrites par injection locale d'une substance irritante dans une articulation (Heilborn, Berge, Arborelius, & Brodin, 2007; Mogil, 2009).

La douleur inflammatoire est efficacement combattue par l'utilisation d'anti-inflammatoires. Il existe deux principales classes d'anti-inflammatoires; les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).

Les AINS agissent en inhibant les enzymes cyclo-oxygénases (COX) à produire, *via* la dégradation de l'acide arachidonique, des prostaglandines, lesquelles, sont d'importants médiateurs de l'inflammation. Ainsi, la prise d'AINS inhibe l'action de dégradation de la COX et bloque la synthèse de médiateurs de l'inflammation (figure 7). On note donc une diminution de l'inflammation (douleur, œdème, chaleur, perte de fonction, érythème) et de la douleur associée car ces médiateurs inflammatoires pro-algogènes ont pour particularité de sensibiliser les nocicepteurs, les rendant de fait plus prompts à réagir (à l'origine de l'allodynie) ou à réagir plus forts (à l'origine de l'hyperalgésie).

Mechanism of action: NSAIDs ■

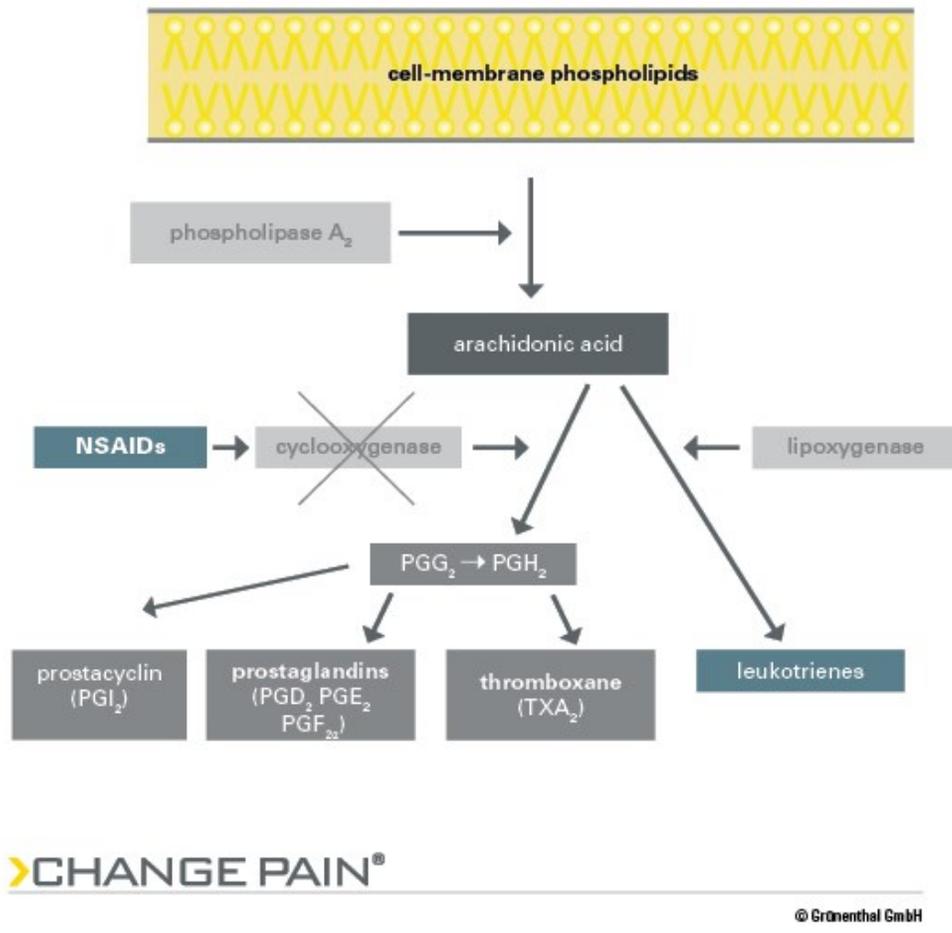


Figure 7 : Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les AINS agissent en bloquant l'enzyme cyclooxygénase, empêchant ainsi la formation de prostaglandines lors de la dégradation de l'acide arachidonique. Il est à noter que certains AINS ont été développés pour leur dualité d'inhibition à la fois de la cyclooxygénase et de la lipogénase (Figure présentée en anglais pour ne pas nuire à la qualité graphique). PGG₂ (prostaglandine G₂), PGH₂ (prostaglandine H₂), PGI₂ (prostacycline I₂), PGD₂ (prostaglandine D₂), PGE₂ (prostaglandine E₂), PGF_{2α} (prostaglandine F_{2α}), TXA₂ (thromboxane A₂) Source : Change

Pain :http://www.change-pain.com/grt-change-pain-portal/GRT-CHANGE-PAIN-PORTAL_Home/Picture_Library/203600166.jsp, 7 février 2014

Il est généralement reconnu qu'il existe deux principales isoformes de la COX ; La COX-1 et la COX-2 (figure 8). La COX-1 est présente de façon constitutive dans les tissus et impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, de la protection de la muqueuse gastrique et dans le maintien de l'hémodynamique rénale. La COX-2 est plutôt inductible et est surexprimée dans les tissus inflammatoires. Toutefois, il apparaît désormais évident que la COX-2 dispose d'activité constitutive ou réparatrice, en particulier au niveau rénal et gastrique. En effet, les cocktails de cytokines pro-inflammatoires et cataboliques induisent sa production. L'administration d'AINS pour réduire la douleur associée vise donc principalement à inhiber la COX-2 (Zweers et al., 2011).

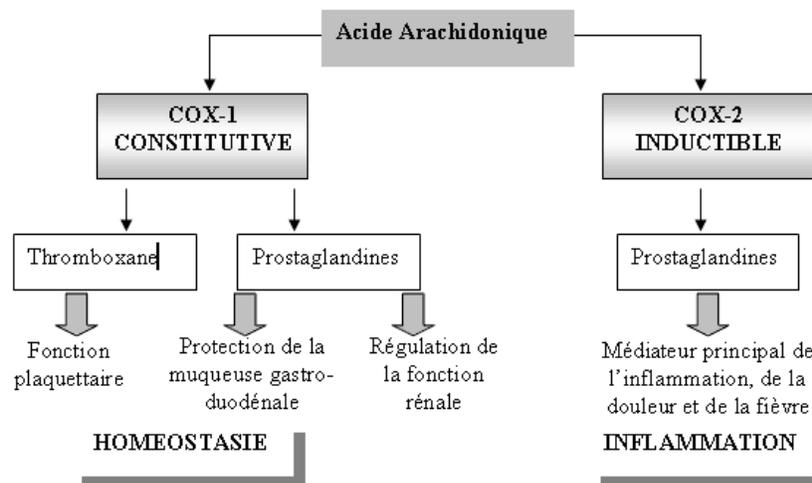


Figure 8 : Représentation schématique de deux principales catégories de l'enzyme cyclooxygénase (COX-1 et COX-2) et leur fonctions. Source : Faculté de médecine de

Toulouse, Deuxième cycle des études en médecine, Réaction inflammatoire : Aspects biologiques et cliniques, conduite à tenir : <http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item112/index11.htm>, 10 février 2014

Les AIS aussi réduisent l'inflammation. Leur action est principalement antagoniste sur les signaux de transcription des médiateurs de l'inflammation. En effet, les AIS exercent une action directe et indirecte sur la transcription des médiateurs pro et anti-inflammatoires ainsi qu'un effet post-translationnel en diminuant la demi-vie des ARN messagers des cytokines pro-inflammatoires. Étant impliqués dans diverses fonctions vitales, leurs importants effets secondaires systémiques limitent leur utilisation à des fins anti-inflammatoires aux cas les plus lourds (Creamer, 1997; Hameed & Ihm, 2012).

1.3.3 Douleur neuropathique

La douleur d'origine neuropathique correspond au processus douloureux dont la source se retrouve directement dans le système nerveux (périphérique ou central). Une atteinte nerveuse en est le plus souvent la cause. Cette atteinte nerveuse peut mener à une hyper ou une hypoesthésie et est souvent associée à un dysfonctionnement des voies nociceptives (Boulanger, 2005).

Ce type de douleur est souvent évalué à l'aide de modèles qui miment un dommage partiel aux nerfs périphériques par coupure physique, étirement ou élongation, compression ou inflammation nerveuse. Ces dommages peuvent être créés par chirurgie, dommage thermique, inflammatoire ischémique, des segments centraux ou périphériques (Mogil, 2009).

Les agents les plus souvent utilisés pour contrôler la douleur d'origine neurologique sont les régulateurs des canaux ioniques (sodiques, calciques). En effet, les canaux calciques sont responsables de réguler l'activation des neurones nociceptifs reliés à la douleur neurologique et inflammatoire.

Plusieurs catégories de canaux calciques sont répertoriées. Dans le cadre du contrôle de la douleur, ce sont surtout les canaux de type N (activés par un voltage élevé) et les canaux de type T (activés par un bas voltage) qui sont ciblés (Bourinet et al., 2005; Pexton, Moeller-Bertram, Schilling, & Wallace, 2011).

Les inhibiteurs de canaux de type N peuvent se subdiviser en deux catégories : les petites molécules inhibitrices ainsi que l'utilisation de conotoxines synthétiques. Les conotoxines sont en fait des dérivés synthétiques d'un groupe de peptides neurotoxiques présent dans le venin des escargots marins. L'effet de cette toxine est de bloquer le canal calcique du neurone afférent. Ainsi, en empêchant le relargage de certains neuropeptides (dont la substance P), le blocage des canaux calciques entraîne la suppression de la douleur (Catterall, Perez-Reyes, Snutch, & Striessnig, 2005).

Les canaux calciques de type T sont reconnus pour leur rôle dans l'excitabilité et l'amplification du signal nociceptif au niveau du neurone sensoriel ainsi que dans l'hyperexcitabilité des neurones afférents. Ainsi, toute molécule ayant un effet inhibiteur spécifique à ces canaux, peut potentiellement être efficace pour bloquer la transmission de

l'influx nerveux et contrer l'hyperalgésie reliée à la douleur neuropathique (Pexton et al., 2011).

Les canaux sodiques font aussi bonne figure parmi les cibles thérapeutiques de la douleur neuropathique. Présents dans la régulation d'une multitude de fonction physiologique (dont la contractilité musculaire cardiaque et la régulation du seuil de convulsion), leur utilisation doit tout de même être très spécifique. Leur effet principal est de contrôler l'excitabilité cellulaire. Ainsi, les bloqueurs des canaux sodiques sont utilisés dans le traitement de la douleur chronique et dans la prévention des états d'hyperalgésie et d'allodynie (Zuliani, Rivara, Fantini, & Costantino, 2010).

Les canaux sodiques reliés au contrôle de la douleur neuropathique forment une famille de 9 sous-unités (Nav1.1 à Nav1.9) (Bhattacharya, Wickenden, & Chaplan, 2009). On retrouve ces canaux sodiques dans le système nerveux tant au niveau central que périphérique (à l'exception du canal Nav1.4). Les bloqueurs des canaux sodiques, ont donc pour effet de perturber la perception, la transmission et l'intégration des signaux nociceptifs.

1.3.4 Douleur reliée à un état maladif

Ces modèles tentent de représenter la somme de douleur ressentie lors de syndromes cliniques bien connus tels brûlure, cancer, pancréatite, neuropathie diabétique *etc.* (Mogil, 2009). La plupart de ces modèles regroupent différents types de douleur (nociceptive, neurologique ou inflammatoire). Par exemple, lors de brûlure, une composante de la douleur ressentie est de

nature inflammatoire tandis qu'une autre composante est neurologique par le biais d'une hypersensibilisation des fibres afférentes, source d'allodynie.

La douleur reliée à un cancer peut avoir une origine inflammatoire de par sa nature et l'implication du système immunitaire, neuropathique (par compression nerveuse, atteinte directe d'un nerf, réaction auto-immunitaire), *etc.* Ainsi, plusieurs catégories de molécules analgésiques sont utilisées en combinaison pour combattre la douleur ressentie lors de ces états maladifs.

1.3.4.1 Douleur arthrosique

L'arthrose, étant une condition engendrant de la douleur de nature à la fois inflammatoire, nociceptive et neuropathique est donc considérée dans cette catégorie de conditions ou état maladif douloureux (Orita et al., 2011; Thakur, Rahman, Hobbs, Dickenson, & Bennett, 2012)

La maladie étant très présente dans la population mondiale, les modèles d'arthrose sont courants dans la recherche de nouvelles thérapies analgésiques.

L'arthrose désigne un ensemble de changements articulaires dégénératifs de causes diverses. En règle générale, les changements articulaires observables sont les suivants : amincissement du cartilage articulaire, épaissement / sclérose de l'os sous-chondral, présence d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux, mauvais alignement articulaire et perte de cartilage. Un degré variable d'inflammation du synovium, une atteinte ligamentaire ou méniscale ainsi que l'œdème de la moelle osseuse sont aussi souvent observés (Fernihough et al., 2004). Les nocicepteurs sont aussi retrouvés au niveau des tendons et ligaments,

membrane synoviale, structure méniscales, périoste et os sous-chondral (McDougall, Bray, & Sharkey, 1997). La douleur liée à l'arthrose (figure 9) est ainsi sujette aux phénomènes de modulation périphérique et centrale. Ainsi, lors de l'établissement d'une douleur d'arthrose chronique, l'hyperalgésie et l'allodynie sont souvent présentes.

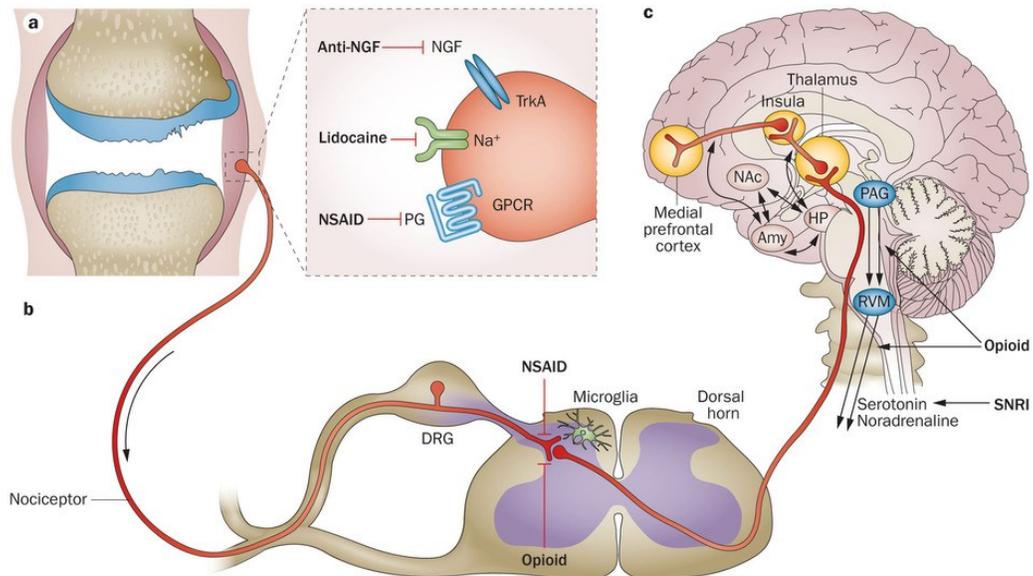


Figure 9 : Représentation schématique de la neuro-anatomie de la nociception et des cibles thérapeutiques associés à l'arthrose (Figure présentée en anglais pour ne pas nuire à la qualité graphique) a : les nocicepteurs présents au seins de l'articulation acheminent l'influx douloureux de la périphérie vers le centre. Les molécules analgésiques utilisées pour combattre l'arthrose agissent au niveau de ces nocicepteurs périphériques .b : Le signal nociceptif est acheminé au niveau du ganglion dorsal de la moelle épinière. Les AINS de même que les opioïdes peuvent agir au site ce cette première synapse. c : Le signal nociceptif est ensuite acheminé au système nerveux central via les voies spinothalamiques et intégré. Les opioïdes ont aussi une action analgésique au niveau du système nerveux central. Amy (amygdala), DRG (dorsal root ganglion), GPCR (G-protein coupled receptor) HP (hippocampus), NAc (nucleus accumbens), NGF (nerve growth factor), PAG (peri-aqueductal

grey), *PG* (*prostaglandin*), *RVM* (*rostral ventromedial medulla*), *SNRI* (*serotonin–noradrenaline reuptake inhibitor*), (Malfait & Schnitzer, 2013).

1.4 Modèles d'arthrose chez le rat

Chez le rat, près de 80% des neurones afférents de la capsule articulaire sont des nocicepteurs (McDougall, 2006). Cet animal est très populaire dans les études d'arthrose. Plusieurs modèles de la pathologie sont décrits dans la littérature. Le modèle animal idéal doit représenter à la fois la douleur arthrosique et les changements dégénératifs dans l'articulation atteinte. Les changements dégénératifs doivent s'établir relativement rapidement et être hautement reproductibles (Bove et al., 2003).

1.4.1 Chimique enzymatique

1.4.1.1 Mono-iodoacétate de sodium (MIA)

Le modèle « MIA » consiste en une injection unique de mono-iodoacétate de sodium (MIA) au niveau articulaire (souvent le genou), causant ainsi une inhibition de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphatase déshydrogénase des chondrocytes (Bove et al., 2003). La résultante de cette inhibition est une interruption de la glycolyse des chondrocytes et leur mort cellulaire (Bove et al., 2003; Janusz et al., 2002).

Cette mort cellulaire résulte donc en un amincissement et une fissuration du cartilage articulaire ainsi qu'une exposition de l'os sous-chondral (Guingamp et al., 1997; Guzman,

Evans, Bove, Morenko, & Kilgore, 2003). Les changements dégénératifs vont jusqu'à inclure un collapse de la matrice cartilagineuse et la production d'ostéophytes (Bove et al., 2003).

Cette chronologie pathologique est donc semblable à la physiopathologie de l'arthrose chez l'homme (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Guingamp et al., 1997; Guzman et al., 2003). Pour cette raison, le modèle d'arthrose par injection intra articulaire de MIA est couramment utilisé dans les études précliniques (Bove et al., 2003).

De façon plus précise, les changements histopathologiques et leur représentation antalgique ont été démontrés comme bi phasiques et dose-dépendants (Bove et al., 2003; Pomonis et al., 2005). En effet, plusieurs auteurs ont démontré que le modèle MIA présente d'abord une phase initiale d'origine inflammatoire avec un maximum d'intensité autour du troisième jour suivant l'injection intra articulaire. La durée moyenne de cette phase est de sept jours. Par la suite, la phase inflammatoire s'atténue et les changements dégénératifs relatifs à la mort cellulaire des chondrocytes progressent. Leurs effets algiques sont clairement visibles dès le jour quatorze post-injection par apparition d'une douleur chronique dont le point culminant varie selon la dose et le volume injecté (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997; Pomonis et al., 2005). Il a été démontré que le modèle MIA produit une hyperalgésie et une allodynie mesurables (Fernihough et al., 2004).

1.4.1.2 Poly-éthylène-amine (PEA)

Les articulations vieillissantes ont plus tendance à développer de l'arthrose. Ce phénomène pourrait être expliqué par un changement dans la morphologie des chondrocytes ainsi que dans

la matrice de protéoglycanes. Puisqu'il a été démontré que la quantité de protéoglycanes diminue avec le vieillissement et avec l'apparition d'arthrose, plusieurs auteurs ont affirmé que la dégénérescence des protéoglycanes articulaires est une caractéristique du développement de l'arthrose. Un modèle animal utilisant le rat a ainsi été proposé. Il fait intervenir l'utilisation d'un agent colorant cationique : le poly-éthylène-amine (PEA) (Sauren et al., 1994). Le PEA est en effet utilisé pour mettre en évidence les protéoglycanes à la microscopie électronique en se liant spécifiquement à leur site anionique. Cette technique de coloration a été utilisée pour démontrer les différences de localisation et de concentration des protéoglycanes dans le cartilage articulaire de patients jeunes et âgés avec ou sans arthrose (Sauren et al., 1994). Il a été proposé, que la liaison des PEA avec les sites anioniques des protéoglycanes articulaires avait pour résultante une baisse de fonction des protéoglycanes. Cette situation entraînerait une diminution de l'hydratation de la matrice cartilagineuse et donc, une diminution de volume de la dite matrice. Un certain degré de nuisance des échanges métaboliques du tissu articulaire est aussi soupçonné, entraînant la destruction de la matrice cartilagineuse et l'apparition d'arthrose (Sakano et al., 2000).

1.4.1.3 Cytokines

L'arthrose, comme plusieurs maladies chroniques, comporte plusieurs mécanismes pathologiques inflammatoires. Ainsi, l'utilisation directe de cytokine pro-inflammatoire a aussi été démontrée comme modèle chimique d'arthrose chez le rat (Bolon et al., 2004; Malfait et al., 2009; Scott et al., 2009). Puisque l'interleukine 1 bêta (IL-1 β) et le facteur nécrotique tumoral alpha (TNF- α) sont deux cytokines bien connues dans la pathogénie de l'arthrite rhumatoïde, leur utilisation dans des modèles aigus d'arthrose tombe sous le sens.

Ainsi, la stimulation d'aggrécanases *via* l'injection intra articulaire de TNF- α a été proposée comme modèle animal d'arthrose (Malfait et al., 2009). En effet, l'aggrécane est une protéoglycane responsable des propriétés élastiques du cartilage articulaire. Sa diminution est donc responsable d'une perte de fonction et d'une dégradation du cartilage articulaire pouvant mener à l'apparition d'arthrose. L'utilisation de TNF- α pour stimuler les aggrécanases et dégrader la matrice de protéoglycanes représente donc un modèle *in vivo* de dégradation du cartilage. Comme le modèle produit des dommages à la matrice de protéoglycanes qui sont d'apparition rapide et assez légers, cette technique pourrait donc théoriquement être utilisée pour évaluer le potentiel chondro-protecteur de nouvelles molécules en développement (Malfait et al., 2009).

Dans le même ordre d'idée, l'IL-1 β est connue pour ses propriétés pro-inflammatoires et sa capacité à déclencher une cascade d'évènements menant à des réponses inflammatoires et des changements dégénératifs au sein de l'articulation visée (Scott et al., 2009). Le principe du modèle d'arthrite suivant l'injection d'IL-1 β est sensiblement le même que celui du TNF- α . Par contre, la pathogénie du développement d'arthrose repose plus sur l'activation d'une migration leucocytaire et diapédèse au sein des vaisseaux de la membrane synoviale avec pour résultante, une synovite avec hypertrophie de la membrane synoviale et l'accumulation de débris cellulaires dans l'espace intra articulaire (Scott et al., 2009).

Il semblerait que le modèle IL-1 β soit plus efficace pour amener des changements osseux, telles la résorption osseuse et la production d'ostéoclastes que le modèle TNF- α (Bolon et al., 2004).

1.4.1.4 Papaïne

Un autre modèle chimique d'arthrose consiste en une unique injection intra-articulaire de papaïne, une enzyme protéolytique. Le mode d'action de ce modèle repose sur l'action de dégradation sélective de l'enzyme sur les composants de la matrice cartilagineuse. Son action protéolytique est responsable de l'hydrolyse de la partie protéique des protéoglycanes (Grevenstein, Michiels, Arens-Corell, & Stofft, 1991). Secondairement, cette dégradation protéique entraîne la libération d'IL-1 ce qui contribue à l'inflammation synoviale (Grevenstein et al., 1991). Le processus résulte en œdème du cartilage, inflammation synoviale, diminution des protéoglycanes et nécrose des chondrocytes. Selon la dose, les dommages semblent réversibles (Grevenstein et al., 1991). Toutefois, les dommages engendrés sont ceux de la phase aiguë du développement d'arthrose. En effet, aucun dommage chronique n'a pu être démontré par l'injection intra-articulaire de papaïne chez le rat (Pomonis et al., 2005). L'utilisation d'un tel modèle demeure donc relativement restreinte.

1.4.1.5 Collagénase

L'injection intra-articulaire de collagénase a aussi été démontrée comme étant un modèle valable d'arthrose chez le rat. Ce modèle a été utilisé pour reproduire l'arthrose des facettes articulaires vertébrales dans le cas de douleur chronique au dos (Yeh et al., 2008). Le mode d'action repose directement sur l'action de dégradation des collagénases sur le collagène et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire.

Ainsi, l'accumulation de débris cellulaires dans l'espace intra-articulaire contribue également à augmenter le niveau de dégradation. Au niveau tissulaire, l'effet résulte en de l'inflammation synoviale, l'hypocellularité des chondrocytes ainsi qu'en une fibrillation et une perte du cartilage articulaire et un remodelage de l'os sous-chondral. La formation d'ostéophytes a aussi pu être démontrée. Ces changements dégénératifs correspondent à ceux trouvés lors de cas d'arthrose chez l'humain. Autre fait intéressant, le modèle collagénase semble produire une sévérité d'arthrose qui soit dose et temps-dépendant (Yeh et al., 2008).

1.4.2 Chirurgicaux

Les modèles chirurgicaux d'arthrose visent à représenter les problèmes d'instabilité articulaire humaine (accidentels ou reliés à une mauvaise conformation), communément regroupés sous le terme « d'arthrose post-traumatique » (Little & Hunter, 2013). Trois techniques sont couramment décrites et utilisées seules ou en combinaison : la ménisectomie médiale, la déchirure du ménisque médial ainsi que la section du ligament croisé crânial et/ou médial collatéral (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004; Hayami et al., 2006; Janusz et al., 2002). Différents protocoles chirurgicaux sont bien décrits dans la littérature (Allen et al., 2012; Appleton et al., 2007; Fernihough et al., 2004; Hayami et al., 2006; Janusz et al., 2002; Karahan, Kincaid, Kammermann, & Wright, 2001).

Dans le cas de la ménisectomie médiale, l'instabilité de l'articulation ainsi créée amène la formation d'ostéophytes et l'amincissement du cartilage articulaire (avec un degré relatif d'exposition de l'os sous-chondral). Ces dommages articulaires ont tendance à être focalisés dans la région des dommages méniscaux (Allen et al., 2012; Fernihough et al., 2004; Janusz et

al., 2002). La douleur articulaire et ses manifestations comportementales ont donc tendance à être moins prononcées qu'avec un modèle chimique tel le MIA (Fernihough et al., 2004). De plus, la biomécanique humaine étant passablement différente que celle d'un rongeur quadrupède, l'apparition et la progression des dommages articulaires de même cause peut différer entre les deux espèces (Fernihough et al., 2004).

1.4.3 Spontanés

L'apparition spontanée d'arthrose sur un individu vieillissant a été démontrée chez la souris et chez le cobaye (Bendele et al., 1999; Salo, Seeratten, Erwin, & Bray, 2002; Salo & Tatton, 1993). Cette apparition spontanée d'arthrose semble reliée à la disparition graduelle d'innervation de l'articulation, un processus de vieillissement reconnu au niveau du système nerveux central et qui peut vraisemblablement être extrapolé au système nerveux périphérique.

En effet, la perte d'innervation articulaire engendrerait des processus aberrants de distribution des charges articulaires, par le biais d'une augmentation de l'instabilité articulaire et par un contrôle neuromusculaire inadéquat (Salo, Seeratten, et al., 2002). L'instabilité articulaire serait créée par un désordre de l'équilibre neurologique de l'articulation et par une perte relative de sensibilité menant à la modification voire la perte des réflexes normaux de protection (Salo, Seeratten, et al., 2002).

Un modèle de dénervation articulaire, simulant l'effet du vieillissement a ainsi été proposé. Il consiste en une injection intra-articulaire d'une neurotoxine couplée à un anticorps monoclonal ciblant un récepteur trouvé spécifiquement à la surface des terminaisons

nerveuses articulaires. Ainsi, cette immunotoxine pourra, par transport rétrograde dans l'axone, atteindre le corps cellulaire du neurone et diriger son effet toxique de façon hautement spécifique (Salo, Hogervorst, Seerattan, Rucker, & Bray, 2002).

1.4.4 Créé par l'exercice intense et soutenu

Bien qu'un exercice modéré soit reconnu bénéfique pour la santé des articulations, l'exercice intense et soutenu, de par son effet de charge excessive sur l'articulation, peut contribuer à la dégénérescence articulaire dans ses phases initiales (Troncy, 2013). Un modèle d'arthrose créé par un exercice intense et soutenu chez le rat a ainsi été proposé.

La première version de ce modèle fait état de l'utilisation d'une roue d'exercice pour rongeur (Pap et al., 1998). L'animal, par le biais d'une stimulation neurologique des régions nerveuses centrales de renforcement et de récompense, est amené à courir une distance de trente kilomètres en six semaines. Ce type de stimulation intracrânienne augmente de près de cent fois la motivation naturelle de l'animal à courir.

L'utilisation de la roue d'exercice a pour effet d'augmenter considérablement la charge pondérale sur les genoux et les chevilles de l'animal puisque celui-ci doit utiliser sa propre force cinétique pour mobiliser la roue. De plus, de par sa configuration, la roue permet un exercice de mobilisation en pente (montante ou descendante) ce qui augmente encore la charge articulaire.

La dégradation articulaire semble être médiée par l'action d'une enzyme de dégradation (la métalloprotéinase matricielle de type 3 ou MMP-3, ou Stromélysine). La production de MMP-3 semble être proportionnelle à la distance parcourue sur la roue d'exercice. Les changements histopathologiques articulaires sont représentatifs des changements dégénératifs initiaux d'arthrose connus chez l'humain, soit fibrillation et fissuration du cartilage articulaire (Pap et al., 1998).

Une variante de ce modèle a aussi été proposée faisant intervenir l'utilisation du tapis roulant en remplacement de la roue d'exercice et de la chirurgie intracrânienne requise pour l'implantation des électrodes de stimulation. C'est donc une stimulation électrique à la queue de l'animal qui le pousse à se maintenir sur la courroie du tapis. Encore une fois, une distance minimale de trente km de course a été nécessaire pour produire des changements dégénératifs articulaires (Beckett et al., 2012; Franciozi et al., 2013; Tang et al., 2008).

1.4.5 Hormonaux

Il a été établi que la prévalence d'arthrose chez la femme post-ménopausée est plus grande que chez l'homme du même âge. Le rôle protecteur de l'œstrogène sur le cartilage articulaire a été proposé comme une hypothèse valable expliquant cette prévalence. Ainsi, un modèle d'arthrose utilisant des rates ovariectomisées pouvant reproduire cette condition a été proposé.

Il a donc été démontré que l'ovariectomie chez la rate provoque une déficience en œstrogène. On note également une diminution de la synthèse de collagène de type 2 chez ces sujets amenant ainsi une augmentation de la dégénérescence articulaire. L'administration de

modulateur des récepteurs d'œstrogène semble aussi avoir un effet protecteur pour les articulations. (Christgau et al., 2004; Hoegh-Andersen et al., 2004)

Les changements articulaires provoqués chez les rates ovariectomisées étant légers, ce modèle pourrait être utilisé pour étudier les stades initiaux d'arthrose ou encore le potentiel chondroprotecteur de futurs médicaments chez les sujets post-ménopausés

1.5 Modalités d'évaluation de la douleur

Ainsi, les modèles de douleur utilisant des animaux sont largement répandus et largement utilisés de par la similitude de leur physiopathologie avec les processus douloureux humains. Encore faut-il être capable de mesurer efficacement la douleur chez le modèle animal choisi. En effet, toute la difficulté repose sur cette question. Comment mesurer la douleur chez l'animal de façon objective et répétitive d'une mesure à une autre? Certaines mesures réflexes sont utilisées depuis plusieurs décennies. Récemment, d'autres chercheurs utilisent également la modification du comportement ou encore la présence ou la disparition de comportements pouvant suggérer une douleur chez l'animal. En gardant en tête les composantes sensori-discriminative et émotive-comportementale de la douleur, il apparaît qu'aucun test utilisé seul ne semble idéal (*i.e.* complet).

1.5.1 Mesures réflexes

Les mesures réflexes (communément appelées mesures de retrait), correspondent à la réaction spinale (retrait d'un membre) ou spinobulbospinale (sursauter, tendre l'abdomen) engendrée

par une stimulation thermique, mécanique ou électrique d'un endroit du corps (Mogil, 2009). Ainsi, les mesures réflexes visent à mesurer chez l'animal, le seuil de retrait (ou de réaction) lors de l'exposition à une stimulation douloureuse. Ces techniques de mesure visent aussi principalement à démontrer et quantifier la présence d'hypersensibilité *via* l'hyperalgésie et l'allodynie (Loeser & Treede, 2008). Ainsi donc, la réaction engendrée par ces stimulations peut aussi servir à démontrer le phénomène de douleur référée (un phénomène aussi reconnu chez l'humain) (Combe et al., 2004; Mogil & Crager, 2004).

L'hyperalgésie (douleur d'intensité anormalement élevée induite par un stimulus nociceptif) et l'allodynie (douleur causée par un stimulus normalement non-nociceptif) (Parenti, Arico, Ronsisvalle, & Scoto, 2012) sont des éléments recherchés dans l'évaluation des mesures réflexes. De façon générale, il est reconnu que l'hyperalgésie est généralement détectée avant la mise en place de l'allodynie, tous deux faisant partie de la même famille; l'hypersensibilité (Loeser & Treede, 2008). On vise à en détecter l'apparition lors de processus douloureux ou encore à tester leur variation d'intensité suivant l'administration d'une drogue potentiellement analgésique. Différents instruments et protocoles peuvent être utilisés pour détecter l'apparition d'hyperalgésie et d'allodynie. De façon très générale, on peut catégoriser ces tests et protocoles en stimulus thermique ou mécanique (Luis-Delgado et al., 2006). Les tests thermiques sont généralement axés sur la détection de la variation du temps requis pour l'apparition d'un comportement d'évitement tandis que les tests mécaniques vont mesurer la variation de l'intensité du seuil de retrait. (Luis-Delgado et al., 2006)

1.5.1.1 Technique de Randall-Selitto (figure 10):

Cette technique ayant pour but la démonstration d'une hypersensibilité a été décrite en 1957 par L.O Randall et J.J Selitto (Randall & Selitto, 1957). Elle vise à mesurer le seuil de réponse à une pression mécanique exercée sur la surface plantaire ou dorsale d'un membre (Anseloni, Ennis, & Lidow, 2003; Bujalska & Gumulka, 2001; Santos-Nogueira, Redondo Castro, Mancuso, & Navarro, 2012). Principalement décrite pour mesurer l'hyperalgésie, cette technique peut aussi être utilisée pour mettre en évidence l'allodynie chez un sujet atteint. En effet, la différence principale entre allodynie et hyperalgésie étant la force du stimulus exercé (capable ou non de stimuler des nocicepteurs périphériques normaux), une adaptation de la technique Randall-Selitto (principalement en utilisant un embout rond pour effectuer une pression), pourrait permettre d'appliquer un stimulus normalement non douloureux et ainsi de mesurer l'allodynie sur un animal.



Figure 10 : *L'animal est installé dans le harnais de contention et une pression est appliquée sur le membre de façon à produire une réponse de retrait. L'intensité de la force appliquée est mesurée par l'appareil. Source : IITC Life Science :*

http://www.iitcinc.com/Product%20pages/Analgesia/Randall_Selitto.html, 19 décembre 2013

1.5.1.2 Filaments de von Frey

Cette technique mécanique dont la théorie d'application a été établie initialement par Maximilian von Frey en 1896 vise l'application de filaments rigides sur la surface plantaire de la patte du sujet de recherche. La technique actuelle utilisée a depuis été modifiée (Chaplan, Bach, Pogrel, Chung, & Yaksh, 1994) . L'application se répète à des pressions de plus en plus fortes, soit en augmentant le diamètre du fil utilisé (version manuelle), soit en appuyant davantage *via* un appareil électronique (figure 11), jusqu'à l'obtention d'une réaction de retrait du membre par l'animal testé. Dans le cas de l'appareil électronique, on choisit la sonde pour sa rigidité en fonction du modèle testé, plus flexible pour les modèles neuropathiques, plus rigide lorsqu'on ne s'attend pas à une hypersensibilité très développée. En effet, la mesure se fait sans que la sonde ne soit pliée. Ainsi, la connaissance de la force exercée, nécessaire à l'obtention du retrait, permet de quantifier le seuil de réaction de l'animal et de comparer celui-ci à un autre membre soumis à un processus douloureux, de détecter la présence d'hypersensibilité ou encore à mesurer l'efficacité d'une molécule analgésique.

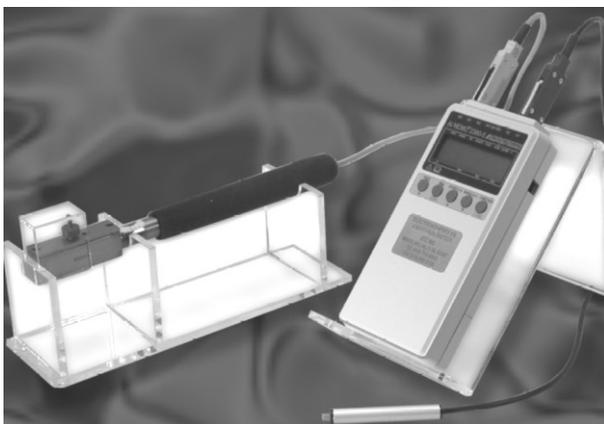


Figure 11 : *Appareillage électronique permettant la variation de l'intensité du seuil de retrait à l'aide de filaments de von Frey. Source : IITC life Science :*

<http://www.iitcinc.com/vonfrey.html>, 19 décembre 2013.

1.5.1.3 Test d'agrippement

Un autre moyen mécanique de mettre en évidence l'hypersensibilité est à l'aide du test d'agrippement (Beyreuther, Geis, Stohr, & Sommer, 2007). Le principe de ce test est de mesurer la force maximale et le temps de retenu qu'un animal peut maintenir en s'agrippant sur une barre de tension spécialement conçue à cet effet. Le test se base sur le fait que le phénomène d'allodynie va engendrer une diminution de la force et du temps d'agrippement d'un animal atteint.

1.5.1.4 Test du retrait de la queue

Ce test à nature thermique vise à calculer et comparer le temps de réaction (retrait) de l'animal duquel la queue est soumise à une stimulation thermique. Deux variantes de ce test sont connues. La première vise à appliquer une chaleur radiante sur une petite surface de la queue. La deuxième consiste plutôt à plonger la queue de l'animal dans un bassin d'eau d'une température fixe et prédéterminée, Dans les deux cas, il est important de limiter la durée du test de façon à ne pas créer de lésion à l'animal (Le Bars et al., 2001).

1.5.1.6 Test plantaire de Hargreaves

En 1988, Hargreaves décrit une technique thermique d'évaluation du seuil de retrait chez le rongeur. (Hargreaves, Dubner, Brown, Flores, & Joris, 1988). Cette technique est semblable dans son principe d'application au test du retrait de la queue puisqu'elle implique l'application d'une source de chaleur sous la patte et la mesure du temps nécessaire au retrait. Elle permet

aussi de détecter des comportements liés à l'inconfort (exemple, le léchage du membre lésé). L'animal est libre de ses mouvements, étant placé dans une boîte transparente. Le stimulus thermique est appliqué sous la patte, à travers le plancher de la boîte. L'avantage du test de retrait de la patte est qu'il cible seulement les réflexes nociceptifs et évite de stimuler les centres de thermorégulation centraux (la queue étant un important organe de thermorégulation chez le rongeur (Le Bars et al., 2001)). Il permet également d'utiliser le membre sain comme contrôle.

1.5.1.7 Plaque chauffante

Une autre variante des tests à stimulation thermique est la plaque chauffante. Cette technique initialement décrite par Eddy et Leimbach (Eddy & Leimbach, 1953) vise à placer l'animal sur une plaque chauffante et à augmenter la température jusqu'à l'obtention d'une réponse de retrait (un saut, le léchage ou le retrait du membre lésé).

Bien que facilement mesurable chez les animaux et les humains par des tests simples, les réflexes de retrait dépendent entièrement de la bonne intégrité du système nerveux de transmission de la douleur. Comme leur nom l'indique, ils ne sont que des réflexes et ne tiennent aucunement compte d'un aspect important dans l'évaluation de la douleur clinique, à savoir : l'intervention des composants cognitifs et émotionnels d'un apprentissage et de processus supraspinaux (Mogil, 2009).

1.5.2 Mesures innées/spontanées

Les mesures innées ou spontanées sont des manifestations de la douleur qui n'impliquent pas seulement l'arc réflexe nociceptif tel que décrit dans la section des mesures réflexes. Elles comprennent les mesures cinétiques ou cinématiques ainsi que d'autres tests bien précis.

1.5.2.1 Mesures cinétiques (statique ou dynamique)

Les mesures cinétiques, qu'elles soient statiques ou dynamiques font intervenir un phénomène de protection où l'animal protège son membre douloureux en diminuant la charge pondérale sur le dit membre. Il s'agit d'une implication consciente visant à soulager le membre douloureux. Le test d'incapacitance statique aussi appelé test de douleur par mesure comparative est un outil couramment utilisé pour mesurer la cinétique statique (Bove et al., 2003; Nakazato-Imasato & Kurebayashi, 2009). Ainsi, l'animal redressé et en appui sur ses deux membres postérieurs va sciemment ajuster sa distribution pondérale sur chacun des deux membres de manière à soulager son membre douloureux. Un dispositif de test muni de deux balances contiguës de type plateau et d'un dispositif de contention permettant à l'animal une station debout, permettra de mesurer efficacement cette distribution pondérale (figure 12).



Figure 12 : *L'animal est installé dans le dispositif de contention et la distribution pondérale sur chaque membre postérieur est mesurée par l'appareil. Source : IITC Life Science : <http://www.iitcinc.com/Incapacitane.html>, 19 décembre 2013*

La variante dynamique de la mesure de distribution pondérale repose sur le principe qu'une mesure obtenue sur un animal libre de ses mouvements, non-stressé par un confinement quelconque et dans une posture normale, possède des avantages sur une mesure statique confinée. Les dispositifs de test comportent une cage avec un tapis instrumenté de capteurs de pression. Une prise vidéo de l'animal pendant la durée du test permet d'éliminer les mesures imprécises (exemple pendant le toilettage) (Tetreault, Dansereau, Dore-Savard, Beaudet, & Sarret, 2011).

1.5.2.2 Évaluation de la démarche (cinématique)

L'analyse de la démarche aussi appelée analyse cinématique est aussi une façon de caractériser la douleur ressentie par un animal. En effet, il est reconnu que dans un effort de

protection d'un membre douloureux, une asymétrie se développe au niveau de la démarche. Entre-autre, le temps de pose du membre et le pic de force verticale sont souvent diminués relativement au membre sain (Miyagi et al., 2011).

Un système a fait ses preuves dans l'évaluation de la douleur du genou et de la présence d'allodynie. Il s'agit du CatWalk. Ce système d'analyse permet d'obtenir facilement une série de mesures dynamiques et statiques qui sont automatiquement synthétisées par un ordinateur et comparées tant de façon individuelle que par rapport au membre contro-latéral (Gabriel, Marcus, Honig, Walenkamp, & Joosten, 2007; Hamers, Lankhorst, van Laar, Veldhuis, & Gispen, 2001; Miyagi et al., 2011; Vrinten & Hamers, 2003).

Le principe du CatWalk est simple. Une plaque de verre est éclairée par une lumière fluorescente. Les propriétés réfléchissantes du verre reflètent complètement les rayons lumineux à l'intérieur de la plaque. Ainsi, à chaque fois qu'un objet touche la surface du verre (en l'occurrence la face plantaire des membres de l'animal déambulant), la lumière se reflète vers le bas créant ainsi une image d'empreinte de pas lumineuse. Un système d'enregistrement muni d'une caméra se retrouve sous la plaque. Ainsi, l'intensité de l'empreinte lumineuse (mesurée en pixel) rend état de la force exercée par le membre. Le temps de pose, l'amplitude de la foulée et une multitude d'autres mesures sont ainsi récoltées et analysées (Ferland, Laverty, Beaudry, & Vachon, 2011; Gabriel et al., 2007; Hamers et al., 2001; Vrinten & Hamers, 2003). On pourrait également imaginer évaluer l'aptitude du rat à réaliser un exercice sur un tapis roulant (figure 13).



Figure 13 : *Ce dispositif muni d'une courroie mobile permet d'offrir une période d'exercice de durée et vitesse déterminée. Source : Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec.*

1.5.2.3 Évaluation de l'activité générale :

L'évaluation de l'activité générale peut aussi servir à caractériser le niveau de douleur d'un sujet. Cette mesure est connue pour être influencée par le cycle circadien, l'âge du sujet, son genre et sa souche (Jansen van't Land & Hendriksen, 1995). Certaines molécules analgésiques peuvent aussi, *via* un effet sédatif, interférer dans l'évaluation du niveau d'activité générale.

L'évaluation du niveau d'activité volontaire peut être une façon de considérer la composante émotionnelle de la douleur. Chez le rongeur, l'utilisation volontaire de la roue d'exercice peut être une façon d'évaluer le niveau d'activité générale du sujet d'étude (Cobos et al., 2012).

1.5.2.4 Échelle de l'expression faciale :

Des mimiques faciales sont souvent associées à l'expression de la douleur chez l'humain. Récemment, des échelles spécifiques aux rongeurs ont été créés pour mesurer la douleur chez ces espèces (Langford et al., 2010; Leach et al., 2012). De plus, l'échelle murine a montré son efficacité à évaluer la douleur post-chirurgicale (Leach et al., 2012). Cependant, cette échelle n'a pas réussi à démontrer la douleur dans les modèles de douleur neuropathiques chronique (Whittaker & Howarth, 2013).

Bien que l'échelle de mimique faciale développé dans le modèle murin ait été testé pour son exactitude et sa fiabilité inter-observateurs (Langford et al., 2010), et que les résultats initiaux semblent indiquer que cet outil est très prometteur, un plus grand effort de validation est nécessaire, notamment pour établir sa pertinence dans les différents modèles de douleur et reliés à différents processus douloureux (Whittaker & Howarth, 2013).

1.5.2.5 Niveau de sommeil

Le dérèglement des périodes de sommeil peut aussi servir à démontrer un état douloureux (Roizenblatt et al., 2010; Silva, Andersen, & Tufik, 2008). Le temps de sommeil, le nombre de réveil et la durée requise pour s'endormir peuvent tous varier selon le niveau de douleur ressentie. Pour déterminer efficacement les périodes de sommeil, des implants intracrâniens sont souvent utilisés.

1.5.3 Tests opérants

Pratiquement toutes les modalités d'évaluation d'un stimulus nociceptif décrites jusqu'à présent évaluent l'intégrité de l'axe réflexe périphérique. Cependant, la douleur n'est pas qu'un réflexe. De plus, les comportements tels l'automutilation, le léchage excessif ciblé, *etc.* ne peuvent être automatiquement considérés comme des indices de douleurs, la sensation à l'origine de ces manifestations n'étant pas spécifiques à la douleur et pouvant tout aussi bien être un engourdissement ou un fourmillement (Vierck, Hansson, & Yezierski, 2008).

Ainsi, il est parfaitement établi que la douleur est une expérience complexe faisant intervenir une composante affective, émotive, sensorielle et émotionnelle ainsi qu'un phénomène d'apprentissage comprenant des comportements acquis d'échappement et d'évitement (Zimmerman, 1986). Les tests opérants ont donc été conçus dans l'optique de mesurer l'effet du système nerveux central (particulièrement dans les régions cortico-limbiques) sur l'expérience aversive qu'est la douleur (LaBuda & Fuchs, 2000; Marcinkiewicz et al., 2009; Vierck, Acosta-Rua, Rossi, & Neubert, 2008; Vierck, Hansson, et al., 2008).

La base des tests opérants est de permettre à l'animal de faire l'apprentissage de la douleur dans un environnement contrôlé, tout en lui permettant de choisir entre deux situations possibles et ainsi déterminer la composante dissuasive d'un processus douloureux (LaBuda & Fuchs, 2000). Le désir d'éviter la douleur est tout à fait indicateur de la réponse affective d'une lésion nociceptive. Le test opérant permet donc de limiter le stress et l'anticipation de la contrainte physique puisque l'animal est libre de ses mouvements dans le dispositif du test (Neubert et al., 2005).

Il existe trois grandes catégories de tests opérants utilisés dans les études d'évaluation de la douleur : L'évitement acquis, l'environnement aversif, ainsi que le conflit de renforcement (Mogil, 2009).

1.5.3.1 Évitement acquis

Le test d'évitement acquis consiste à donner le choix à l'animal de subir une stimulation thermique ou d'échapper à cette stimulation en choisissant volontairement un environnement normalement aversif. Ainsi, un animal souffrant d'allodynie ou d'hyperalgésie pourrait préférer grimper sur une plateforme thermo-neutre mais vivement éclairée plutôt que de rester en contact avec une surface de stimulation thermique. Comme précédemment mentionné, ce test permet entre autres de démontrer la présence d'hypersensibilité (Morgan, Carter, DuPree, Yeziarski, & Vierck, 2008).

Comme la plupart des tests opérants, l'animal doit d'abord être entraîné avant de pouvoir utiliser le procédé dans l'évaluation de nouvelles drogues. En effet, il faut obtenir un animal qui connaît le procédé d'échappement et qui de façon répétitive, évite de subir une stimulation thermique donnée. Ainsi, toute variation dans la présence d'évitement volontaire tendra à démontrer une différence de perception du stimulus nociceptif (Morgan et al., 2008). Le potentiel analgésique d'une drogue peut ainsi être démontré lorsqu'on a un animal dont on a préalablement perçu la présence d'hypersensibilité et qui, suite à l'administration de cet analgésique, cesse de chercher à fuir la stimulation thermique.

1.5.3.2 Environnement aversif

Le principe des tests fondé sur l'environnement aversif est encore une fois d'offrir un choix à l'animal. Deux procédés de test sont décrits dans la littérature, soit : La préférence thermique et le paradigme du comportement d'échappement / d'évitement.

1.5.3.2.1 Préférence thermique

Le dispositif du test de préférence thermique repose sur le choix que peut faire un animal entre un environnement chaud et un autre froid. En effet, le test le mieux connu consiste à placer l'animal dans un boîtier séparé en deux compartiments offrant un libre accès d'un côté à l'autre. Un des compartiments a un sol maintenu à une température chaude (généralement 45 °C) tandis que l'autre compartiment possède un sol maintenu à une température froide (généralement 10°C) L'animal doit choisir entre deux températures différentes (Morgan et al., 2008).

L'hypersensibilité chaude ou froide et sa modulation par des drogues analgésiques peut ainsi être étudiée et démontrée. Encore une fois, une acclimatation et un entraînement doivent être offerts préalablement au test pour s'assurer d'avoir des comportements stables et significatifs dans le dispositif du test (Datta, Chatterjee, Kline, & Wiley, 2010; Marcinkiewicz et al., 2009; Morgan et al., 2008).

1.5.3.2.2 Paradigme du comportement d'échappement / évitement

Le dispositif du test de paradigme du comportement d'échappement / d'évitement consiste à offrir à l'animal le choix entre demeurer dans son environnement favori mais être soumis à un stimulus aversif ou à se déplacer librement vers un environnement déplaisant mais où il n'est pas soumis à un stimulus aversif. La plupart du temps, l'animal a le choix entre un environnement sombre ou éclairé (*cf.* Figure 1 dans Chapitre 2 : Article original de recherche). Le stimulus aversif, associé à l'environnement préféré (le côté sombre) consiste en la stimulation plantaire du membre douloureux par un filament de von Frey. La stimulation doit être de force équivalente à celle requise pour produire une réponse de retrait sur un animal sain. Lorsque l'animal décide volontairement de se placer du côté éclairé, on stimule sa patte saine avec le même filament de von Frey. Ainsi, on peut comparer le pourcentage de temps volontairement passé par l'animal dans chacune des chambres du dispositif (sombre et éclairée) et le comparer selon différents protocoles d'analgésie. L'acclimatation et l'entraînement au dispositif du test sont encore une fois essentiels à la validité du procédé (Boyce-Rustay et al., 2010; LaBuda & Fuchs, 2000; Pedersen & Blackburn-Munro, 2006).

1.5.3.3 Conflit de renforcement

Les tests opérants basés sur le conflit de renforcement utilisent la motivation à recevoir une récompense comme indice de confort. Ainsi un animal peut décider de se soumettre volontairement à un stimulus aversif pour recevoir une récompense ou éviter toute stimulation aversive.

Un entraînement préalable permet à l'animal de se familiariser avec le processus de renforcement positif. Lorsque l'animal sain a compris qu'en se soumettant à un stimulus aversif (ex., une petite stimulation électrique ou thermique), il reçoit une récompense, il choisit le nombre de stimulations aversives et de récompenses qu'il désire recevoir. Le même animal soumis à l'influence d'une douleur ou d'un phénomène d'hypersensibilité pourrait volontairement cesser de recevoir une récompense pour éviter de ressentir une douleur accentuée (cette fois-ci).

L'action d'un analgésique peut ainsi être démontrée par le retour du comportement (et quantifiable objectivement par le nombre requis de stimulations pour recevoir le nombre voulu de récompenses) visant l'obtention de la récompense (Mauderli, Acosta-Rua, & Vierck, 2000; Neubert et al., 2005).

Hypothèses et objectifs

Compte tenu de la grande diversité des modèles animaux d'arthrose et de tests d'évaluation de la douleur, il devient difficile de choisir le protocole le plus approprié pour une étude spécifique. Il est également pratiquement impossible de comparer des résultats issus de différentes équipes de recherche. Dans un effort de favoriser le transfert de résultats de la recherche préclinique vers la recherche clinique, le but de ce projet de recherche est donc de proposer un protocole diversifié de moyens d'évaluation de la douleur qui permettra d'obtenir des résultats valides et pertinents.

Il a d'abord été décidé d'exclure toute méthode d'évaluation subjective de façon à limiter le biais lié au genre du manipulateur et à niveau d'expérience individuel. Suite à la revue de la littérature, il est apparu que les tests réflexes sont bien reconnus pour évaluer l'aspect sensoriel et discriminatif de la douleur. De plus il semble que les tests innés et spontanés de même que les tests opérants sont dorénavant inévitables si on veut évaluer l'aspect émotionnel et comportemental d'un phénomène douloureux. Malgré leur popularité grandissante, il a été observé que ces tests nécessitent encore un effort de validation. En effet, nous n'avons pas trouvé de références pertinentes chez le rongeur permettant d'exclure l'influence environnementale et le niveau d'exercice sur le résultat de ces moyens d'évaluation. Aussi, l'influence de l'observateur (autre que le genre et le niveau d'expérience) et la répétabilité de ces mesures restaient encore, à notre avis, à démontrer. Ce projet de recherche a donc été conçu en deux phases pour d'abord vérifier l'hypothèse que le cycle circadien de même que

l'exposition à une période d'exercice ne modifieront pas la lecture des moyens d'évaluation de la douleur étudiés et que ces mesures présenteront une bonne répétabilité dans le temps, lorsque qu'effectuées par différents observateurs sur des sujets sains. Cette première phase a ensuite été complétée par la vérification de l'hypothèse seconde que l'exposition des animaux à une période d'acclimatation adéquate permettrait de faire diminuer la variabilité des résultats obtenus.

Ensuite, la deuxième phase de ce projet visait à valider les résultats obtenus en phase 1 à l'aide d'un modèle de douleur pertinent. L'arthrose, de par sa grande prévalence dans la population humaine, fait l'objet de beaucoup d'effort de la communauté scientifique pour la découverte de nouvelle thérapie analgésique. Il a aussi été établi dans la revue de la littérature que les modèles d'arthrose sont de bons modèles de douleur chronique permettant d'évaluer le potentiel analgésique de nouveaux composés pharmaceutiques.

Notre choix s'est rapidement arrêté sur le modèle MIA car notre revue de la littérature récente a permis de démontrer qu'il est présentement le plus populaire chez les rongeurs. Ainsi, afin de proposer un protocole valide et pertinent, il nous apparaît essentiel d'utiliser ce modèle reconnu et utilisé pour sa capacité à induire des changements dégénératifs et nociceptifs similaires à la pathologie rencontrée chez l'humain. Par la réalisation de la deuxième phase de notre projet, nous voulions vérifier l'hypothèse que les tests d'évaluation ayant obtenu les meilleurs résultats en phase 1, combinés à une période d'acclimatation appropriée, permettraient de détecter les changements nociceptifs associés aux changements induits par l'injection intra-articulaire de MIA, et que ces mêmes tests seraient à même de démontrer l'action analgésique d'une administration intra-articulaire de lidocaïne.

Pour ce faire, les objectifs spécifiques sont :

- Tester l'influence de l'observateur (reproductibilité inter-observateurs), du cycle circadien et de l'exercice sur la répétabilité de différentes méthodes de la douleur.
- Déterminer la répétabilité dans le temps de différentes méthodes d'évaluation de la douleur.
- Déterminer le protocole d'acclimatation aux méthodes d'évaluation favorisant l'obtention de résultats les plus fiables.
- Valider ce protocole d'évaluation de la douleur à l'aide du modèle MIA chez le rat en comparant d'abord la sensibilité des différentes méthodes à tester les altérations douloureuses induites par l'injection de MIA, puis la sensibilité de réponse au traitement représenté par une injection intra-articulaire de lidocaïne.

Chapitre 2 : Article original de recherche

(Article soumis pour publication au *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, JPM-S-14-00034)

CONCURRENT VALIDITY OF DIFFERENT PAIN ASSESSMENT METHODS IN THE RAT OSTEOARTHRITIS MIA MODEL

Julie Gervais^a, Colombe Otis^{a,b}, Martin Guillot^{a,b}, Julie-Anne Gervais^a, Dominique Gauvin^{a,b}, Catherine Péthel^a, Simon Authier^c, Marc-André Dansereau^d, Philippe Sarret^d, Johanne Martel-Pelletier^b, Jean-Pierre Pelletier^b, Eric Troncy^{a,b}

- a. Research Group in Animal Pharmacology of Quebec (GREPAQ), Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine – Université de Montréal, 1500 des Vétérinaires St., Saint-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada
- b. Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM), 900 Saint-Denis St., Tour Viger, Montreal (QC), H2X 0A9, Canada
- c. CIToxLAB North America, Inc., 445 Armand Frappier, Laval (QC), H7V 4B3 Canada
- d. Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Ave. North, Sherbrooke (QC), J1H 5N4, Canada

Corresponding author: Pr. Eric Troncy

2.1 Abstract

Introduction:

Despite a large number of animal osteoarthritis (OA) models and pain assessment methods, translation of new therapies from preclinical research to clinical practice is limited. The goal of this study performed in a well-established chemical model of OA pain in rats was to 1) assess the repeatability of measurement and the influence of environment, exercise and acclimatization to different pain assessment outcomes, and 2) test the concurrent validity of the most reliable methods.

Method:

Using non-painful Sprague-Dawley rats, the repeatability and inter-rater reliability of reflexive mechanical hyperalgesia evaluation (MHE), punctate tactile allodynia evaluation (PTAE), spontaneous static weight bearing (SWB), treadmill exercise, Rotarod, and operant place escape/avoidance paradigm (PEAP) were assessed by calculating intraclass correlation coefficient (ICC). The most reliable acclimatization protocol was determined by comparison of coefficient of variations (including dynamic weight bearing [DWB]). The most reliable methods were then tested comparatively for their sensitivity and responsiveness to treatment in the monoiodoacetate (MIA) model of OA. Two 2 mg MIA groups (including one repeated punctual treatment with intra-articular lidocaine) and a Sham group (0.9% saline) received an intra-articular (50 μ L) injection and were tested over 21 days with SWB, PTAE, treadmill and PEAP.

Results:

No effect of environment or exercise was observed with the MHE, PTAE, SWB, treadmill PEAP or Rotarod. All tested methods excluding MHE offered good repeatability. The most reliable acclimatization protocol included 5 days of assessment with exposure to the testing methods every other day. OA pain related changes were successfully demonstrated with the SWB, PTAE, treadmill and PEAP, with PEAP being the most responsive to the analgesic effect of intra-articular lidocaine.

Discussion:

This study established the most reliable and sensitive pain assessment methods, and optimized acclimatization protocols. Moreover, results placed the operant testing as more responsive to intra-articular lidocaine analgesia than other tests used.

2.2 Keywords

Animal model, Osteoarthritis, experimental, Monosodium iodoacetate, Methods, validation, Acclimatization, Pain metrology

2.3 Abbreviations

Adj (adjusted)

BW (body weight)

CV (coefficient of variation)

DWB (dynamic weight bearing)

ICC (intraclass correlation coefficient)
LHP (left hind paw)
MHE (mechanical hyperalgesia evaluation)
MIA (monosodium iodoacetate)
n (number of animals, sample size)
NTC (number of total crossings)
OA (osteoarthritis)
PEAP (place escape / avoidance paradigm)
PTAE (punctate tactile allodynia evaluation)
PWT (paw withdrawal threshold)
QST (quantitative sensory testing)
RHP (right hind paw)
RPM (revolution per minute)
SEM (standard error of the mean)
SD (standard deviation)
SWB (static weight bearing)
TNTC (treadmill number of total crossings)

2.4 Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common of all arthropathies in our aging population, is a leading cause of disability and represents a large (and growing) worldwide socio-economic cost (Little & Hunter, 2013). It affects approximately 30 million adults in the USA (Lawrence et al.,

2008), and this number is expected to double by 2020 (Hootman & Helmick, 2006), with longer life expectancy and the increasing incidence of obesity, two major risk factors for this disease. Despite critical importance in drug development, translation of OA therapies focusing either on structure (disease-modifying OA drugs) or pain (symptom-modifying OA drugs) from the bench to bedside has slowed (Kissin, 2010; Little & Hunter, 2013; Palmer & Sundstrom, 2013). Differences between preclinical OA models and the disease evaluated in clinical trials contribute to this failure. Rising criticism is noted over the classic translational research, which failed to predict efficacy of chronic pain treatments (Dolgin, 2010; Mao, 2009; Mogil, 2009; Yeziarski & Vierck, 2011). Most critics have targeted the poor validity and clinical relevance of experimental pain models using laboratory animals (Blackburn-Munro, 2004; Vierck, Hansson, et al., 2008). It has also been hypothesized that current animal models are too reliant on evoked withdrawal responses and that development of meaningful assessment tools allowing, for instance, the measurement of continuous spontaneous pain might help to translate experimental data to clinical practice (Dolgin, 2010; Mogil & Crager, 2004).

Animal models of OA are classified as induced or spontaneous conditions. Induced models are further subdivided into surgical and chemical models. Surgical induction of OA (by ligament transection and/or meniscectomy) alters the exerted strain on the joint and/or the load bearing, leading to joint instability and OA development. Chemical models are generated by intra-articular injection of modifying factors or by systemically administering noxious agents, such as quinolones. Spontaneous models include naturally occurring and genetic models (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

Surgical models mimic post-traumatic OA in young humans, and the resulting molecular pathophysiology could differ from the age-related OA most commonly targeted in clinical trials. Moreover, surgical OA is associated with a high degree of inter-individual variability (structure and pain), and a long development is required to obtain significant alterations. Post-traumatic OA genetically engineered mouse strains have identified attractive disease-modifying targets (Little & Hunter, 2013), but may lack the natural history of the disease. Naturally occurring OA models are recognized to present a pathophysiology closest to clinical OA, particularly in large animals (Moreau, Pelletier, et al., 2013), but also entail similar experimental disadvantages (long period to onset, and variability of disease development). In contrast, chemical models cause the most rapidly progressing OA, requiring less invasive procedures and enabling standardization (with increased sample homogeneity). Selection of an animal model to study OA can be challenging, taking into consideration the pathophysiology, convenience of the model (*e.g.*, time and cost) and reliability of the results (Bendele et al., 1999; Mogil, Davis, & Derbyshire, 2010).

The monosodium iodoacetate (MIA) chemical model as described 25 years ago induces cartilage degeneration by disruption of chondrocyte metabolism (*i.e.*, breaking down the cellular aerobic glycolysis). In rats, the MIA model is well established and resembles the histological and pain-related characteristics of human degenerative OA (Bove et al., 2003; Combe et al., 2004; Fernihough et al., 2004; Ferreira-Gomes, Adaes, Sousa, Mendonca, & Castro-Lopes, 2012; Guingamp et al., 1997; Guzman et al., 2003; Kelly et al., 2012; Kobayashi et al., 2003; Liu et al., 2011; Marker & Pomonis, 2012; Nagase, Kumakura, & Shimada, 2012; Okun et al., 2012; Orita et al., 2011; Pomonis et al., 2005; Thakur et al., 2012;

Vonsy, Ghandehari, & Dickenson, 2009). Owing to the extensive description of the pain response in rats, the MIA OA model was proposed as a standard OA model for pain assessment (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013; Marker & Pomonis, 2012). A single intra-articular injection of MIA will result in onset and progression of the disease with associated pain. This model presents a bi-phasic disease profile with an acute (inflammatory) phase around the third day post-injection, and a chronic (appearance of cartilage degeneration) phase two to three weeks later (Bove et al., 2003; Guingamp et al., 1997; Kelly et al., 2012; Liu et al., 2011; Thakur et al., 2012). Recent research also demonstrated that the MIA model of OA has the potential to create neuropathic pain by significant injury to intra- and extra-articular axons leading to dorsal root ganglion cell firing (Ferreira-Gomes et al., 2012; Orita et al., 2011; Thakur et al., 2012) and generating ongoing pain associated with spontaneous and stimulus-evoked pain expression (Kelly et al., 2012; Liu et al., 2011; Okun et al., 2012).

The quality of pain assessment methodologies is a cornerstone of preclinical studies targeting new analgesics (Barrot, 2012; Blackburn-Munro, 2004; Edwards, Sarlani, Wesselmann, & Fillingim, 2005; Fernihough et al., 2004; Mao, 2009; Mogil & Crager, 2004; Vierck, Hansson, et al., 2008). Three different categories of pain expression can be evaluated in rats: reflexive measures, spontaneous measures and operant responses (Barrot, 2012; Mogil, 2009). First, reflex measures using stimulus-evoked responses are commonly used in rats to assess potential hyperalgesia and allodynia (Boyce-Rustay et al., 2010; Mogil, 2009; Vierck, Kline, & Wiley, 2004; Yalcin, Charlet, Freund-Mercier, Barrot, & Poisbeau, 2009). These measures are generated by exposure to thermal, mechanical or electrical stimulus, involving mainly spinal level pain processing, and are also increasingly present in human quantitative sensory testing

(QST) pain characterization (Cruz-Almeida & Fillingim, 2013; Negus et al., 2006; Suokas et al., 2012). Second, spontaneous measures can also be useful to quantify pain and/or well-being (Mogil, 2009). For example, kinetic (static or dynamic weight distribution) (Bove et al., 2003) or kinematic (Allen et al., 2012) (ambulation evaluation or characterization) measurement, and spontaneous activity (Nagase et al., 2012) can be obtained to indirectly assess ‘the quality of life’ in OA models. Pain-induced behaviors (scratching/licking/biting, hypophagia, vocalisation, *etc.*) should also be considered in this category (Negus et al., 2006). Finally, operant responses have been more recently introduced to characterize pain in animal models (Fuchs & McNabb, 2012; LaBuda & Fuchs, 2000; Li, 2013; Mogil, 2009; Navratilova, Xie, King, & Porreca, 2013; Vierck, Kline, & Wiley, 2003; Vierck et al., 2004). Operant testing is opposite to reflexive response testing as it allows the quantification of behavioural responses at higher levels of the brain, reproducing multiple dimensions of pain, including affective and cognitive changes and not only sensory-discriminative perception (King, Devine, Vierck, Rodgers, & Yezierski, 2003; Li, 2013; Mauderli et al., 2000; Navratilova et al., 2013). This type of measure allows the observer to evaluate the aversive component of pain as operant tests give the animal an opportunity to avoid the painful condition (Boyce-Rustay et al., 2010; Fuchs & McNabb, 2012; LaBuda & Fuchs, 2000; Li, 2013; Navratilova et al., 2013; Pedersen & Blackburn-Munro, 2006; Vierck, Acosta-Rua, Nelligan, Tester, & Mauderli, 2002; Zhang, Zhang, Hu, & Xu, 2011). Again, three different categories of operant testing in rats are well described: the learned escape (Mogil, 2009), the place preference/aversion (Dixon et al., 2013; Fuchs & McNabb, 2012; Mogil, 2009), and the reinforcement conflict (Mogil, 2009).

With such a variety of methods for pain and analgesic response assessment, it is difficult to opt for the method(s) most adapted to specific conditions. The current study undertook the characterization of a frequently used OA rat model, using intra-articular MIA injection, to establish the reliability and concurrent validity of a panel of pain assessment methods, as well as the influence of environmental conditions, including acclimatization and experimental conditions of manipulation.

2.5 Materials and Methods

The present study was conducted on female (n=58 tested, and 10 spares) Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) ranging from 225-300 g at the beginning of experimentation. The animals were housed under regular laboratory conditions and maintained under a light-dark cycle with food and water provided *ad libitum*.

During the study, care and use of animals were subject to and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (#Rech-1495) and conducted in accordance with principles outlined in the current Guide to the Care and Use of Experimental Animals published by the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health.

2.5.1 Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats

Study design

First, the repeatability of measurements in normal rats and the influence of environment, including observer, inverted circadian cycle (activity during the day) and exercise, were tested to determine a potential effect on different pain assessment outcomes. Second, on the most reliable methods only, the influence of three acclimatization protocols was tested in order to determine the most effective approach to obtain predictable data with low variability.

(i) Ten (10) rats were randomly distributed into two groups (n=5). Animals were acclimated to the test apparatus on two occasions at day -3 and -1 before starting the experimentation. In a cross-over design, the animals were subsequently assessed for three repeated days during light (10:00 – 14:00) and dark (20:00 – 24:00) cycles. Both cycles were separated by a 3-day wash-out period without assessment. Dark cycle evaluations were performed under low intensity red light. Animals were tested each assessment day (n=6) by two observers, with the following methods in this order of evaluation: Mechanical Hyperalgesia Evaluation (MHE), Punctate Tactile Allodynia Evaluation (PTAE), Static Weight Bearing (SWB), Treadmill exercise, MHE, PTAE, SWB, Place Escape/Avoidance Paradigm (PEAP) operant testing without nociceptive stimulation, and Rotarod acceptance. To test inter-rater reliability, two women observers were selected for their different levels of experience in laboratory animals (one intermediate, one with advanced expertise).

In complementary studies (after an acclimatization on two occasions, at day -3 and -1), SWB repeatability was specifically retested over 15 days with two SWB assessments separated by a Treadmill session with a group of n=4 rats. This evaluation was done daily, from day 1 to 5, then on days 8 and 15. Finally, with a group of n=5 rats, the PTAE and PEAP with nociceptive stimulation were performed over 25 days. These evaluations were done daily, from day 1 to 15, and repeated on days 18 and 25.

Body weight was obtained weekly. At the end of each experiment, the animals were returned to their housing colony.

(ii) In order to determine the most efficient acclimatization protocol (associated with the most repeatable data) and compare two different methods to measure weight bearing, the next experiment was conducted as follows: A total of 15 animals were used (3 groups of n=5). The specific study schedule of evaluation is presented in Table I. Briefly, over two weeks, the three different acclimatization protocols included 4, 6 and 8 days of evaluation. The order of assessment was Dynamic Weight Bearing (DWB), SWB, PTAE, MHE, PEAP with nociceptive stimulation, and Treadmill. Animal body weight was obtained weekly. At the end of each experiment, the animals were returned to their housing colony.

Pain Assessment Methods

Mechanical Hyperalgesia Evaluation

The MHE measured the Paw Withdrawal Threshold (PWT) to an increasing pressure stimulus

placed on the dorsal surface of the hind paw using an algometer (Randall Selitto test Paw Pressure Meter[®], IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA), employing a wedge-shaped probe (1.75 mm² of surface) and a cut-off value set at 250 g. The animals were placed in a sling apparatus (Lomir Biomedical Inc., Notre-Dame-de-l'Île-Perrot, QC, Canada). The probe was applied once on the dorsal surface at a steadily increasing pressure. The PWT was determined when the animal removed the paw from the apparatus, and the required pressure was recorded. Withdrawal thresholds were measured on the right and left hind paws. The data were expressed as PWT in grams.

Punctate Tactile Allodynia Evaluation

The PTAE used an Electronic von Frey Anesthesiometer[®] (IITC Life Science Inc.) applied to the plantar surface of the hind paws and measuring the PWT to von Frey ascending mechanical stimuli. Gradually increasing pressure was applied with a mechanical von Frey polypropylene probe (0.7 mm², Rigid Tip[®], IITC Life Science Inc.) fitted to a hand-held force transducer. The Rigid Tip was placed perpendicularly into the mid-plantar surface of the paw. The stimulus was continued until the hind paw was withdrawn or elevated such that the force leveled off. Actions such as vocalization, agitation, jumping, and avoidance were considered indicative of the PWT. Voluntary movements associated with locomotion were not considered to be a withdrawal response. The peak of force in grams was recorded with a cut-off value at 100 g. For each animal, triplicates of each hind paw were taken with a 60 s interval between each stimulus.

Static Weight-Bearing

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

Treadmill exercise and evaluation

All rats followed a forced training over a 20 min period at constant treadmill speed (11 m/min) (IITC Life Science Inc.). To force the animal to exercise on the treadmill belt, each lane was equipped with an independent shocker grid. The intensity of the shocker grid was kept at the minimum required to keep the animal on the exercise belt.

The treadmill number of total crossings (TNTC) was recorded over the whole period, but also reported in blocks of 5 min, in order to potentially detect a within-time change in activity. A ‘total crossing’ was considered completed when the animal crossed the entire length of the lane.

Operant testing

The PEAP was used as an operant testing apparatus (Boyce-Rustay et al., 2010; Fuchs & McNabb, 2012; Zhang et al., 2011). Rats were placed into a test cage apparatus that was

painted half white and half black (Figure 1). Neither side was illuminated with additional light. With the cage on an elevated metal grid, the observer, located below, determined the preferential location of the rat. The 20 min observation period began after 2 min of acclimatization/exploration to the test environment on each occasion.

Without nociceptive stimulation: The percentage of time spent on the black or white side of the test apparatus was calculated from observation of the preferential location every 15s.

With nociceptive stimulation: Every 15 s, if the rat was on the black side of the test apparatus, the plantar surface of the right (ipsilateral to possible MIA intra-articular injection) hind paw (RHP) was stimulated with a thin wire (60 g) in order to prompt withdrawal of the limb.

When the rat was on the white side of the cage, a similar mechanical stimulation was applied, but to the plantar surface of the left (contralateral) hind paw (LHP). The percentage of time in the black and white side of the test apparatus was calculated from observation of the preferential location every 15 s.

The calculations were sequenced by successive blocks (n=4) of 5 min period. Moreover, the total number of crossings from the white to the dark side was noted in order to detect any decrease in activity. If a rat remained in the crossing tunnel, it would be stimulated to advance and complete its crossing.

Rotarod

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

Dynamic Weight-Bearing

The rats were placed in the floor-instrumented cage of the DWB-R[®] incapitance test apparatus (BioSeb, Vitrolles, France). The mat is designed to measure independently the weight borne by each limb of a freely moving animal. Data were recorded over a 5 min period. The system provides a single value for each hind limb, when one pressure captor records a weight of at least 4 g and a minimum of 2 adjacent captors record a weight of at least 1 g, the weight being stationary for at least 0.5 s. The force exerted by each hind limb was measured and analyzed in grams, but reported in %BW.

2.5.2 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model

The second part of the study was conducted in order to test the concurrent validity of different pain assessment methods in the MIA rat OA model. A single intra-articular injection of MIA was performed in the right knee of 16 animals distributed among 2 groups (n=8 each, and 4 spare rats). An additional Sham group (n=8, and 2 spares) received a single intra-articular injection of 0.9% NaCl. For the purpose of the study, one of the two MIA groups also received a punctual lidocaine injection (MIA-L group) in the right knee on days 7, 14 and 21.

Histologic analysis of the right joints was conducted after euthanasia to exclude potential outlier associated with extra-articular injection not leading to OA development (*data not shown*).

Acclimatization period and baseline assessment

The study began with an acclimatization period for the selected optimal outcomes (SWB, PTAE, PEAP, Rotarod and Treadmill), according to the optimal acclimatization (days -14, -7, -5, -3) protocol, obtained in Phase 1. Baseline values were acquired at day -1 in this order of evaluation, following the above-described testing procedures: SWB, PTAE, PEAP with nociceptive stimulation (MIA being intra-articularly injected at day 0 in the right knee), Rotarod and Treadmill.

Intra-articular injection

On day 0, fasted (3 to 6 h) rats from all groups were premedicated with buprenorphine hydrochloride (0.02 mg/kg IM; Buprenex[®] injectable, Reckitt Benckiser Inc., Mississauga, ON, Canada) and mask-anesthetized with a 2% isoflurane – O₂ mixture. After surgical preparation, a single intra-articular injection of 2-mg MIA (Monosodium iodoacetate, BioUltra[®], ≥98%, Sigma-Aldrich Canada Co., no. I9148-5G, Oakville, ON, Canada) dissolved in saline, or saline 0.9% (both 50 µL volume) was administered through the infra-patellar ligament of the right knee, using a 26 gauge, 0.5 inch needle mounted on a 0.5 mL syringe.

On days 7, 14, and 21 post-MIA injection, rats from the MIA-L group were again similarly anesthetized to administer a single intra-articular injection of lidocaine through the infra-patellar ligament of the right knee. Lidocaine Neat[®] (2%, Zoetis Canada, Kirkland, QC, Canada) was injected at a volume of 50 µL using a 26 gauge, 0.5 inch needle mounted on a 0.5 mL syringe.

Post-injection evaluation

The assessments were performed according to the different groups' specific schedules on days 3, 7, 14 and 21 post-injection, and conducted as described in the phase 1 section. For the MIA-L group on days 7, 14, and 21, the evaluation started 20 min after the animal's recovery from anesthesia. The evaluation sequence was as follows: SWB (%BW), PTAE (grams), PEAP (percentage of time on the black side), Rotarod (seconds) and Treadmill (TNTC).

Euthanasia and necropsy

The animals were euthanized with an overdose of isoflurane on day 21 and subjected to decapitation. The right and left knees were collected and stored in formaldehyde 10% jars. The spinal cord was collected by flushing of saline solution through the vertebral column and immediately frozen to -80°C.

2.6 Statistical Analysis

All statistical analyses were performed two-sided with an alpha value set at 0.05 (Phase 1) or 0.1 (Phase 2) using a statistical software program (SAS system for Windows, version 9.2, Cary, NC, USA). The normality of the outcomes was verified using the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance was assessed using the absolute values of the residuals of the mixed model when appropriate.

2.6.1 Phase 1

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

Outcome repeatability (test-retest reliability) was assessed by computing intraclass correlation coefficient (ICC). The ICC is a measure of the proportion of variance that is attributable to

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

2.6.2 Phase 2

The SWB and PTAE data were expressed as the average of the 3 trials obtained on the RHP. Data were then analyzed using linear mixed models (SWB and PTAE) or generalized linear mixed models for repeated measures. Treatment groups and day were considered as fixed effect, and animals in groups as random effect. Models accounted for baseline measurement using baseline as covariate. For each model, the best structure of the covariance model was assessed using a graphical method (plots of covariance *versus* lag in time between pairs of observation compared to different covariance models), and using information criteria that measure the relative fit of competing covariance models. When multiple comparisons were carried out, a Tukey-Kramer adjustment was used to obtain adjusted *P*-values (adj-*P*).

2.7 Results

No significant change in body weight weekly measurement was obtained in any group tested in the Phases 1 and 2.

2.7.1 Phase 1: Reliability of pain assessment methods in normal rats

Data variability and influence of environment

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

Mechanical Hyperalgesia Evaluation

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

Punctate Tactile Allodynia Evaluation

The PTAE in normal rats gave average values of 40-80 g for PWT in both hind limbs. The observer, the circadian cycle, and the treadmill exercise did not produce any effect on PTAE. No significant difference between the right and left hind limbs, or trial (in the triplicates) effect was observed. However, the data presented a marked variability over the whole period (6 days total) with an ICC for both hind limbs <0.5.

Following repetition of the experiment over 25 days with n=5 rats, we found that the ICC improved after excluding the first two weeks of daily evaluation. More precisely, the ICC for days 15, 18, and 25 was >0.8 for both hind limbs (Table II).

Static Weight Bearing

In normal animals, the Incapacitance Meter[®] apparatus showed average values of weight distributed over each hind limb between 35-38%BW. The observer, the circadian cycle, and the treadmill exercise did not produce any effect on SWB. No significant difference between the right and left hind limbs, or trial (in the triplicates) effect was observed. When considering the last two days of assessment (in comparison to the whole period of 6 days), the ICC improved, and this was particularly evident for the SWB ICC after exercise (being >0.7 in both hind limbs for the last two days of assessment). This suggests that the treadmill exercise slightly decreased inter-individual variability in SWB measurement.

Finally, following repetition of evaluation over 15 days with n=4 rats, we found that the ICC improved after excluding the first week of daily evaluation (days 1 to 5), demonstrating a value >0.65 for days 8 and 15 in both hind limbs (Table III).

Treadmill

The treadmill exercise sessions were generally well accepted by female Sprague Dawley rats (84% acceptability). Neither the observer, nor the circadian cycle produced any effect on the

TNTC. The TNTC was extremely repeatable with an ICC of 0.84. A period effect was demonstrated ($P=0.003$) in the 15 day study with $n=4$ rats (Figure 2). The *post hoc* analysis showed that the initial and final 5 min periods were different for TNTC ($P=0.0002$), whereas both intermediate 5 min periods (#2 and 3) were highly repeatable with ICC of 0.73 and 0.92, respectively.

Place Escape/Avoidance Paradigm

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

Rotarod

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

Influence of acclimatization protocols and comparison of assessment method variability

When looking at the different assessment methods for the initial day of acclimatization (day -14), inter-individual variability (CV) appeared lower for the DWB, performing slightly better than the SWB, followed by PEAP, PTAE and Treadmill (TNTC) evaluation, with MHE last (Table IV).

The variation in CV at day -1, normalized to day -14, was compared between acclimatization protocols for the different pain assessment methods (Table IV). The most intensive protocol (#1, Table I) with the highest number of acclimatization procedures (n=8) presented the lowest variability between day -1 and -14, similar to the protocol (#3) with 6 days of acclimatization. The protocol (#2) with only 4 days of acclimatization yielded the highest variations in CV. Based on these results, a new acclimatization protocol was developed and included 5 days (with no successive day) of assessment, on days -14, -7, -5, -3 and -1 with baseline values being recorded at day -1.

2.7.2 Phase 2: Concurrent validity with the MIA model

The acclimatization protocol used at this time yielded similar CV at day -14 and the variations in CV (day -1/day -14) were similar to or lower than for protocols #1 and #3 tested in Phase 1 (*data not shown*). Histological evaluation of the joint revealed no outlier.

The MIA injection successfully induced pain-related changes as assessed by SWB, PTAE, PEAP and TNTC. However, the Rotarod was not sensitive to MIA-induced pain, as all groups

presented similar (maximal) time of acceptance. In consequence, no further analysis was conducted with the testing modality. The Sham injection was not totally neutral when compared to baseline values: while no effect was present for SWB or TNTC, the Sham group presented a transient decrease in PTAE (days 7 and 14) and PEAP (days 3 and 7). The response to lidocaine injection was variable with the assessment method: a clear analgesic effect was noted with PTAE (on days 7 and 14) and PEAP (on days 7, 14 and 21), a trend toward better performance was observed with TNTC, but no difference with MIA was observed for SWB.

Static Weight Bearing (Figure 4)

Analysis of SWB data demonstrated a group effect ($P=0.0005$), a time effect ($P<0.0001$) and a time x group effect ($P=0.005$). In the MIA group, the nadir of weight force was observed on day 3 and was different from values recorded on days 7 (adj- $P=0.005$), 14 (adj- $P=0.01$) and 21 (adj- $P=0.001$). No significant difference within time was observed for the Sham group, whereas in the MIA-L group, day 3 RHP SWB (without lidocaine injection) was lower than on day 14 (adj- $P=0.001$). Compared to the Sham group, the RHP SWB decreased on day 3 in the MIA (adj- $P=0.002$) and the MIA-L (adj- $P=0.001$). Subsequently, the RHP SWB in the MIA group returned to levels similar to the Sham group, and at no time-point of evaluation did the lidocaine injection provide any benefit.

Punctate Tactile Allodynia Evaluation

Descriptive statistics for the RHP PTAE over the evaluation days are provided in Table V. The PWT was lower after the MIA injection on days 3, 7, 14 and 21. This was also the case for the Sham group on days 7 and 14. In the MIA-L group, the nadir in PWT was observed on day 3, whereas a significant increase was observed on day 7 and 14. There was a difference between MIA and MIA-L on days 7 (adj- $P=0.07$) and 14 (adj- $P=0.08$).

Place Escape/Avoidance Paradigm (Figure 5)

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

Treadmill

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

2.8 Discussion

Rat models are common in OA research as they are easy to customize and cost effective (Gregory et al., 2012). The MIA model in particular can be standardized and is associated with

rapidly developing well-characterized lesions (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013; Marker & Pomonis, 2012).

In an effort to improve the translation of preclinical OA research to the clinical field, we conducted a two-phase study to, first, determine the most reliable pain assessment method protocol and, second, validate this protocol in the most common chemical model of OA in rats.

Initially, the effect of the environment (inverted circadian cycle, activity level [treadmill exercise] and observer) was tested using well-known pain assessment tools. Prior studies have demonstrated an effect of the inverted circadian cycle on pain research protocols with rodents (Jansen van't Land & Hendriksen, 1995; John, Brown, Wideman, & Brown, 1994; Perissin, Facchin, & Porro, 2000). Our results did not suggest any impact of conducting the evaluation during daytime (more convenient for the investigator). Our group reported a significant reduction in variability of kinetics measures after exercise in OA cats (Moreau, Guillot, Pelletier, Martel-Pelletier, & Troncy, 2013) and dogs (Beraud, Moreau, & Lussier, 2010). The current study confirmed beneficial effects of exercise to reduce SWB (or other outcome) variability in the MIA rat model of OA. This study also qualified TNTC as a quantitative pain measure using spontaneous behavior. Importantly, the study tested reliability and validity of TNTC, as well as potential impact on results obtained with other pain assessment methods, which may be used concurrently. Our results confirmed that a broad range of methods can be combined for pain assessment in the same animals while maintaining reliability and scientific

validity. Finally, as different observers can introduce some degree of bias in pain assessment outcomes, inter-rater reliability was tested using two different levels (one intermediate, one with advanced expertise) of observers. The methodology included in the current study was accessible to an observer with intermediate experience as no significant difference was identified during analysis based on the level of experience. As limitation, the number of observers was minimal, both observers were from the same gender (women), and only objective assessment methods (so limiting bias related to a subjective observation) were selected for this study. Therefore, such hypothesis (potential influence of experience, and/or gender) would need to be tested in further works before conducting to inferential results. Similarly, for limiting the influence of interferential factors in the study of environment effect, only female rats were used. A possible gender effect would need to be tested in future experiments.

As a recognized indicator of test-retest reliability (Weir, 2005), ICC demonstrated that MHE presents poor repeatability, and this outcome cannot be recommended for a valid reflexive measure of pain. The Phase 1 experiments demonstrated that SWB and PTAE can produce repeatable data when animals (and the observer) are allowed to acclimate to the test device for at least one week. Similarly, SWB showed a slight reduction in variability when measurements were conducted after treadmill exercise. However, beneficial effects of exercise were not as significant in this chemically induced OA rat model as those observed in cats with naturally occurring OA (Guillot et al., 2013; Moreau, Guillot, et al., 2013). The PEAP, Rotarod and Treadmill activity measured as TNTC appeared to be highly repeatable without requiring prolonged acclimatization. It must be noted that in both Treadmill and PEAP, the

intermediate periods 2 and 3 (*i.e.* 5-10, and 10-15 min, respectively) demonstrated the highest repeatability. To our knowledge, this study is the first to evaluate the test-retest (repeatability) and inter-rater (reproducibility) reliabilities of a complete set of pain assessment methods in normal rodents.

As a measure of distribution dispersion that does not require similar units and therefore allows comparison of different variables, the CV of each pain assessment method was verified. At the first evaluation, we again observed the poor metrological property of MHE, presenting the highest inter-individual variability (around 70% CV). Moreover, the different acclimatization protocols did not help to decrease this variability as the variation in CV from the last to the first evaluation was between 0.53 and 1.07. On the other hand, DWB appeared promising with a limited CV, slightly superior to SWB, and substantially more stable than PEAP, PTAE and TNTC (all reasonable inter-individual variability).

The DWB apparatus was recently introduced as a new tool to assess musculoskeletal pain related changes in rodents. The usefulness of DWB to detect nociceptive change and its relief with analgesic drugs was demonstrated in inflammatory, neuropathic and bone cancer pain models in the rat (Dore-Savard et al., 2013; Tetreault et al., 2013; Tetreault et al., 2011) and mice species (Robinson, Sargent, & Hatcher, 2012). Moreover, the DWB was proposed as a superior tool when compared to SWB as it calculates the percentage of weight bearing of each of the four limbs in freely moving animals, offering results much closer to reality than with the usual ipsilateral/contralateral ratio of caged animals. (Dore-Savard et al., 2013; Tetreault et al.,

2011). Other advantages include the possibility of obtaining longer observation periods without the need for direct supervision by an operator, leading to a reduction in stress for the animal during testing.

Our initial ICC and variability results justified the need to investigate different acclimatization protocols and their potential influence on reducing variability in outcome measures. A very limited number of acclimatization days (n=4) over two weeks provided the highest degree of variability, whereas there was no significant difference between 5, 6 and 8 acclimatization sessions over two weeks. Acclimatization every other day such as proposed (days -14, -7, -5, -3 and -1) generated repeatable and reliable results. Furthermore, this schedule of exposure did not appear overwhelming for the animal or the observer. To our knowledge, this study represents the first systematic evaluation of the effect of four different acclimatization protocols on data variability. Our results support the above recommendation as an optimal acclimatization protocol for pain assessment in the rat model.

The second Phase of our project evaluated the validity of the most promising pain assessment methods as determined during Phase 1, when applied to the MIA model of OA in rats. The DWB method had presented positive responses in Phase 1, but was not available for Phase 2 and was therefore not included. Briefly, SWB, PTAE, TNTC and PEAP detected pain related changes following OA induction with an intra-articular MIA injection. However, the Rotarod assessment, as used in our experimental conditions, was not sensitive to OA pain induction. Moreover, the PTAE and PEAP methods demonstrated that the Sham injection of 0.9% NaCl

was not totally neutral. Interestingly, PTAE and PEAP confirmed the analgesic effect of intra-articular lidocaine injection whereas TNTC, and SWB, did not detect the expected analgesic effect. Of the four pain assessment methods evaluated for concurrent validity, only PEAP detected a treatment effect of lidocaine with a significant difference between the MIA-L group and both Sham and MIA groups. Interestingly, body weight was not affected, either by possible manipulations-related stress in Phase 1, and MIA pain induction in Phase 2. This confirms the possible lack of sensitivity of different endpoints used in research for determining “quality of life”: In three of the widely used chronic pain models (spared nerve injury, chronic constriction injury, intraplantar complete Freund’s adjuvant), the “quality of life” of the injured mice seemed to be quite normal as judged by their daily locomotion, feeding, drinking, circadian rhythm and affect states (Urban, Scherrer, Goulding, Tecott, & Basbaum, 2011). Thus, it clearly indicates that such a relationship requires further investigation. Recently, several conditioning procedures have gained popularity for the measurement of affective-motivational component of pain and ongoing pain, all of which move beyond the traditional reflex responses and entail learned behavioral responses that require cerebral processing (Boyce-Rustay et al., 2010; Colpaert et al., 2001; Fuchs & McNabb, 2012; King et al., 2003; King et al., 2009; LaBuda & Fuchs, 2000; Li, 2013; Mauderli et al., 2000; Navratilova et al., 2013; Pedersen & Blackburn-Munro, 2006; Sufka, 1994; Vierck et al., 2002; Zhang et al., 2011)

The enhanced escape/avoidance behavior and lower PWT were previously demonstrated in both neuropathic and inflammatory pain models (Baastrup, Jensen, & Finnerup, 2011; Boyce-Rustay et al., 2010; LaBuda & Fuchs, 2000; LaGraize, Labuda, Rutledge, Jackson, & Fuchs,

2004; Pedersen & Blackburn-Munro, 2006). The higher sensitivity of PEAP compared to PTAE in detecting the efficacy of pain relief was also demonstrated in other studies (Boyce-Rustay et al., 2010).

It would be logical to consider that animals would allocate roughly the similar amount of time in both environments if animals do not show natural preference or aversion to one of the two environments. This study clearly establishes a strong preference of rat, a nocturnal animal, to the dark side of the test apparatus. The acclimatization of rats to the test apparatus is fast, the establishment of a baseline is preferable, and both intermediate periods # 2 and 3 are highly repeatable. Moreover, PEAP assessment includes both classical (Pavlovian) and operant conditioning in the process of training (Li, 2013). When compared with PEAP, PTAE required a longer acclimatization period for both the animal and the observer (at least one week as demonstrated in this study). However, assessing the escape/avoidance behavior using the PEAP required a much longer evaluation time (with 20 to 30 min required for each animal), being too labor-intensive to the experimenters while no automated apparatus is commercially available for this test.

Interestingly, the intra-articular lidocaine injection affected both PTAE and PEAP, and to a lesser degree TNTC, but did not alter changes in weight bearing of the RHP. The lack of effect of lidocaine on SWB could be related to reduced pain in the absence of movement in this model. In a recent study (Okun et al., 2012), intra-articular lidocaine (200 μ L) was efficient to reduce the shift in weight bearing at day 14 post-MIA injection, and only for the highest dose

of MIA (4.8 mg) injected. The lower MIA dose and volume in our study (2 mg, 50 μ L) combined with the lower sensitivity of SWB may be responsible for the lack of effect with this method while PEAP and PTAE accurately captured expected pharmacological effects of lidocaine. Intra-articular lidocaine was chosen as analgesic test in this study, because of the apparently controversial results got in conditioning procedures with non-steroidal anti-inflammatory and opioid drugs (for review, see (Li, 2013)). These findings may be useful when designing analgesia efficacy studies with the MIA-induced OA rat model.

The intra-articular injection of saline (Sham group) generated some hyperalgesia or allodynia, as assessed by PTAE and reflected by the observed change in the operant testing. This is supported by the recent finding of some increased NF- κ B activity on days 3 and 7 measured by *in vivo* luminescent imaging in a transgenic mouse model receiving an intra-articular injection of saline (Bowles et al., 2013). Moreover, in the MIA mouse model tested in the same study, temporal kinetics of NF- κ B activity was strongly correlated with mechanical allodynia (PTAE) and serum interleukin (IL)-6 levels in the inflammatory phase (day 3) of this model, while serum IL-1 β was strongly correlated with pain sensitivities in the chronic pain phase (up to day 28) (Bowles et al., 2013). An increase in the intra-articular pressure and possible injection-related inflammation are proposed to explain this finding. Based on these results, a neutral control group (without intra-articular injection) may be valuable in future experiments.

The MIA model is recognized as valuable in OA research for its ability to detect analgesic

effects of different drugs and compounds. The initial inflammatory phase of this model allows the evaluation of various non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclo-oxygenase inhibitors (Bove et al., 2003; Ivanavicius et al., 2007; Nagase et al., 2012; Pomonis et al., 2005). Moreover, the efficacy of morphine, gabapentin, pregabalin, and transient receptor potential vanilloid receptor antagonist was successfully demonstrated in this model (Combe et al., 2004; Fernihough et al., 2004; Ferreira-Gomes et al., 2012; Ivanavicius et al., 2007; Nagase et al., 2012). The response to treatment was assessed mostly on reflexive measures (mechanical and thermal) (Fernihough et al., 2004; Ferreira-Gomes et al., 2012; Orita et al., 2011; Thakur et al., 2012) as well as kinetic (Bove et al., 2003; Kobayashi et al., 2003; Marker & Pomonis, 2012; Pomonis et al., 2005; Thakur et al., 2012) and kinematic (Guingamp et al., 1997). More recently, the MIA model was shown to induce pain-related changes detected by operant testing (Okun et al., 2012) and spontaneous activity (Nagase et al., 2012). All these studies used different doses of MIA and analgesic therapies as well as different pain assessment tools and protocols. These variations in design limit potential comparison between studies.

In conclusion, our results suggest that the MIA model in the Sprague Dawley rat is relevant for pain assessment of new analgesic therapies for OA. The neuropathic pain component (Kelly et al., 2012; Okun et al., 2012; Orita et al., 2011; Thakur et al., 2012) increases its value as an especially relevant OA pain model. We found that from the tested pain assessment methods, only MHE presented poor metrological properties, but SWB, DWB, PTAE, Rotarod, Treadmill and the operant testing (PEAP) were repeatable under different environmental conditions. The Rotarod test failed to achieve sufficient sensitivity to detect OA pain induced

by the MIA injection in rats. For detecting the analgesic effect of local administration of lidocaine, the most interesting pain assessment method was PEAP, followed by PTAE, whereas SWB presented some limitations in sensitivity. Moreover, it was possible to increase the validity and reliability of pain assessment methods with an optimal acclimatization protocol.

2.9 Acknowledgements

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for its support of pain bioanalyses in the form of a Discovery grant (#327158-2008; Eric Troncy), and the Canada Foundation for Innovation for its support of pain equipment in the form of a Leader Opportunity Fund grant (#24601; Eric Troncy), as well as CIToxLAB North America, Inc. for their collaboration, access to animals, personnel and related facilities. This study was funded by a Pfizer Neuropathic Pain research award (#WS386180; Eric Troncy) from Pfizer Canada, Inc.

Dr. Martin Guillot is the recipient of an Alexander Graham Bell NSERC of Canada Graduate Scholarship for doctorate research, and a Doctoral Scholarship from the Canadian Institutes of Health Research – MENTOR Strategic Training Initiative in Health Research Program.

2.10 Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

2.11 Figures



Figure 1: *Picture of a rat acclimatizing to the place escape/avoidance paradigm device. The test cage apparatus was painted half white and half black and the rat was allowed to move freely from one side to another. Neither side was illuminated with additional light.*

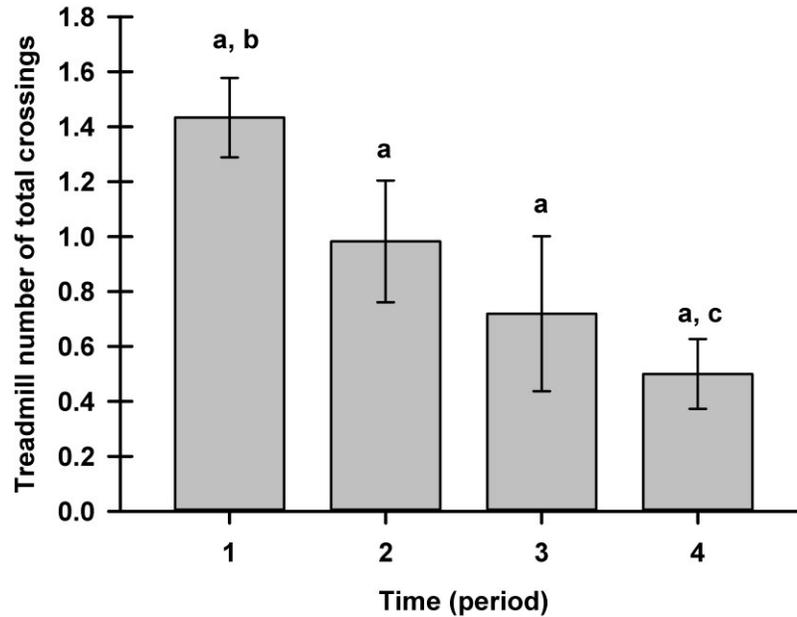


Figure 2: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the treadmill, number of total crossings (TNTC) by period of 5-minute each. (period 1 = 0-5 min, period 2 = 5-10 min, period 3 = 10-15 min, and period 4 = 15-20 min) for n=4 rats tested over 15 days. ^{a,b}, different letters signify significant inter-group statistical difference (adj-P= 0.002). The TNTCs were transformed to fit a lognormal distribution.

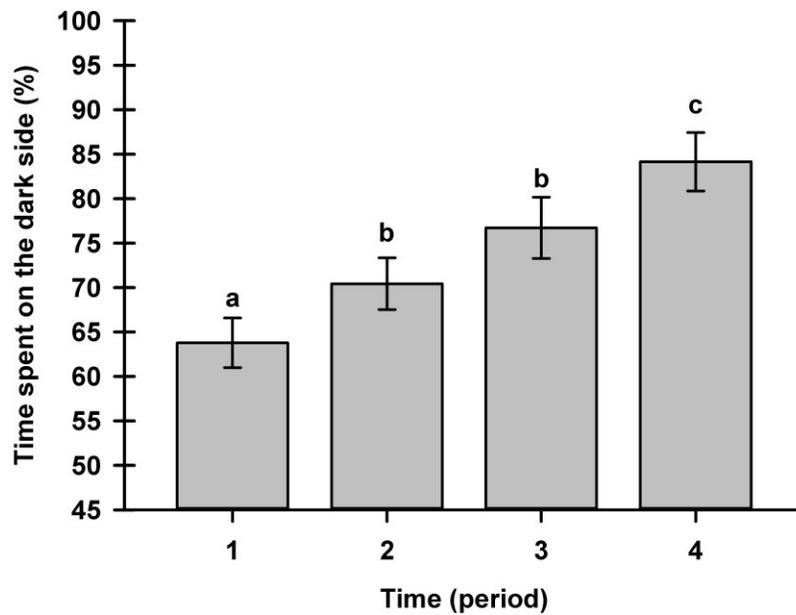


Figure 3: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the place escape/avoidance paradigm (PEAP) percentage of time spent on the dark side by period for $n=5$ rats tested over 25 days. Periods were defined by 5-minute increments (period 1 = 0-5 min, period 2 = 5-10 min, period 3 = 10-15 min, and period 4 = 15-20 min). ^{a,b}, different letters signify significant inter-group statistical difference ($\text{adj-}P \leq 0.0216$).

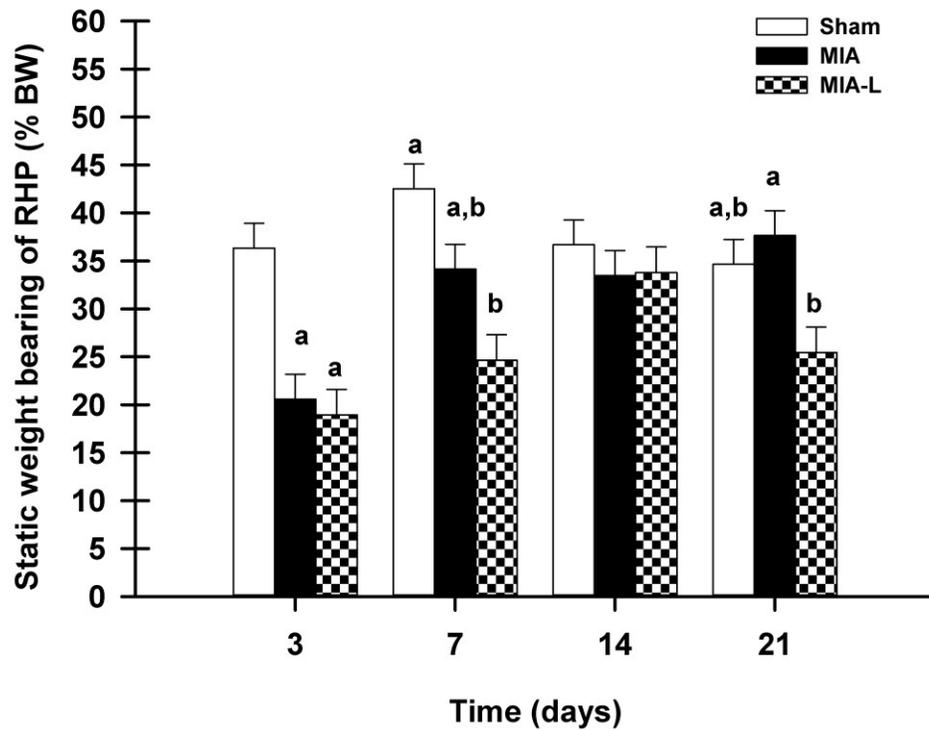


Figure 4: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the percentage body weight (%BW) of the static weight bearing (SWB) for the right hind paw (RHP) on days 3, 7, 14 and 21 post intra-articular injection. On day 3, the MIA injection induced an asymmetry of weight distribution in the MIA ($adj-P=0.0024$) and MIA-L ($adj-P=0.0011$) groups compared to the injection of 0.9% saline. ^{a,b}, different letters signify significant inter-group statistical difference.

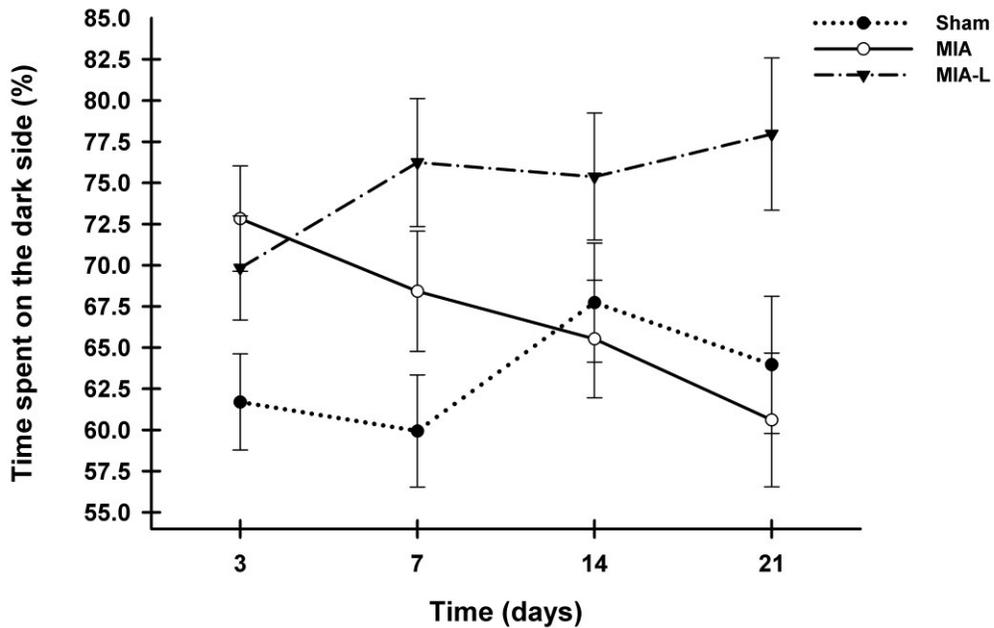


Figure 5: Least square means and standard error of the mean (SEM) of the percentage of time spent on the dark side for the place escape/avoidance paradigm (PEAP) on days 3, 7, 14 and 21 after intra-articular monosodium iodoacetate (MIA) injection. The percentage of time spent on the PEAP dark side was statistically higher in the treated lidocaine group (MIA-L) when compared with MIA ($P=0.07$) and Sham ($P=0.01$) groups. Data presented here were collected for the whole period (20 min) of assessment, but the observed between-group differences were the most obvious during the intermediate periods 2 (5-10 min) and 3 (10-15 min).

2.12 Tables

Table I

Experimental design for the evaluation of the most efficient acclimatization protocol

| Group | Number of animals | Schedule of evaluation |
|--------------|--------------------------|---|
| 1 | n=5 | D-14, D-13, D-12, D-11, D-10, D-8, D-6, D-1 |
| 2 | n=5 | D-14, D-8, D-6, D-1 |
| 3 | n=5 | D-14, D-8, D-7, D-6, D-5, D-1 |

n = number of animals, D = day

Table II

Test-retest reliability of the left hind paw (LHP) and right hind paw (RHP) before and after excluding the first week and the first two weeks of daily punctate tactile allodynia evaluation (PTAE) over 25 days of assessment (n=5 rats)

| | LHP | RHP |
|----------------------------------|------|------|
| ICC over the whole period | 0.78 | 0.26 |
| ICC reduced to day 7, 15, 18, 25 | 0.79 | 0.27 |
| ICC reduced to day 15, 18, 25 | 0.84 | 0.81 |

A group of 5 animals was tested with the PTAE daily from day 1 to 15 and then on days 18 and 25. Intraclass correlation coefficients (ICC) were compared between values calculated for the entire evaluation period and after exclusion of the first week and the first two weeks of assessment.

Table III

Test-retest reliability of the left hind paw (LHP) and right hind paw (RHP) before and after excluding the first week of daily static weight bearing (SWB) evaluation over 15 days of assessment (n=4 rats)

| | Before exercise | | After exercise | |
|---------------------------|-----------------|------|----------------|------|
| | LHP | RHP | LHP | RHP |
| ICC over the whole period | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.23 |
| ICC reduced to day 8, 15 | 0.67 | 0.66 | 0.66 | 0.76 |

A group of 4 animals was tested with the SWB before and after exercise period daily from day 1 to 5 and then on days 8 and 15. Intraclass correlation coefficients (ICC) were compared between values calculated for the entire evaluation period and after exclusion of the first week of assessment.

Table IV

Coefficient of variation (CV) in percentage for each outcome at initial assessment (day -14) and variation in CV* between three protocols of acclimatization for the different methods of pain assessment tested

| Functional Evaluation ** | Group 1 | | Group 2 | | Group 3 | |
|-----------------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|
| | day -14 | day -1 / day -14 | day -14 | day -1 / day -14 | day -14 | day -1 / day -14 |
| | CV | | CV | | CV | |
| DWB | 7.5 | 0.28 | 7.5 | 2.32 | 2.9 | 1.24 |
| SWB | 17.3 | 0.72 | 12.2 | 0.67 | 31.2 | 0.30 |
| PTAE | 42.9 | 0.85 | 27.4 | 1.80 | 22.9 | 1.24 |
| MHE | 63.3 | 0.74 | 75.3 | 0.53 | 71.8 | 1.07 |
| PEAP | 23.8 | 1.01 | 22.8 | 1.11 | 24.1 | 1.07 |
| TNTC | 36.9 | 1.10 | 38.0 | 1.92 | 106.5 | 0.54 |

*The CV values calculated on day -1 were normalized to the CV values on day -14 to test the influence of the acclimatization protocol on the outcome measures.

**The functional evaluation includes the values recorded for the right hind limb, when available (DWB, SWB, PTAE, MHE), or the response of the animal (PEAP and TNTC), where DWB = dynamic weight bearing, SWB = static weight bearing, PTAE = punctate tactile allodynia evaluation, MHE = mechanical hyperalgesia evaluation, PEAP = place escape/avoidance paradigm, TNTC = treadmill number of total crossings.

Table V

Mean and standard deviation (SD) of the punctate tactile allodynia evaluation (PTAE) (g) by experimental group over days

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

Descriptive statistics of the punctate tactile allodynia evaluation (PTAE) of the right hind paw. The measure was obtained for the three groups (8 animals per group) on days 3, 7, 14 and 21 following the intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA). Intra-articular injection was performed on day 0 (2 mg of MIA for the MIA and MIA-L groups and 0.9% NaCl for the Sham group). The MIA-L group also received an intra-articular injection of lidocaine in the right knee on days 7, 14 and 21 before the PTAE.

Chapitre 3 : Discussion générale

3.1 Sommaire des résultats

Comme le but de ce projet de recherche était de proposer un protocole le plus complet possible et visant à la fois les composantes sensori-discriminatives et émotive-comportementales de la douleur, il se devait d'évaluer la pertinence de mesures réflexes (détection de l'hyperalgésie par la méthode de Randall-Selitto (MHE) et détermination de la présence d'allodynie à l'aide de filaments de von Frey (PTAE)), de mesures spontanées (performance à l'exercice (tapis roulant (TNTE) et Rotarod), et distribution de la charge pondérale (statique (SWB) et dynamique (DWB)) ainsi que d'un test opérant (paradigme du comportement d'échappement / évitement (PEAP).

La première étape fut de tester si les facteurs environnementaux tels le cycle circadien, le niveau d'activité et l'identité de l'évaluateur influençaient (ou pas) les résultats obtenus par nos méthodes d'évaluation de la douleur. En effet, d'autres études ont initialement démontré un effet modulateur du cycle circadien (Jansen van't Land & Hendriksen, 1995; John et al., 1994; Perissin et al., 2000). Cependant, ces effets n'avaient pas été vérifiés chez le sujet sain. Aussi, puisqu'il a été montré que l'exercice pouvait avoir un effet sur l'obtention de mesures cinétiques chez le chien et le chat (Beraud et al., 2010; Moreau, Guillot, et al., 2013), il était intéressant de vérifier si cet effet (possiblement étendu à d'autres méthodes d'évaluation de la douleur) était également détectable chez le sujet sain et avec le modèle MIA. La phase 1 de ce projet a mis en lumière le fait qu'aucune influence du cycle circadien ou de l'exercice n'a pu

être détectée chez le rat sain. Pour ce qui est de la fiabilité inter-observateur (ou reproductibilité), comme les tests choisis étaient de nature objective, il est intéressant de noter que le niveau d'expérience dans les outils d'évaluation et la manipulation (niveau intermédiaire, vs. expérimenté) n'a pas eu non plus d'influence. L'objectivité des tests permet aussi de s'assurer que le genre de l'observateur n'influencera pas les résultats obtenus. La reproductibilité des moyens d'évaluation choisis est donc bonne.

Sur des animaux normaux, la répétabilité (ou répétitivité) de ces mêmes mesures a été vérifiée en calculant leur coefficient de corrélation intra-classe (Weir, 2005). La répétitivité des résultats obtenus avec le tapis d'exercice a aussi été évaluée puisque le niveau d'activité peut aussi être une mesure du comportement inné servant à identifier la douleur (Cobos et al., 2012).

Il fut ainsi démontré que le test réflexe MHE ne réussissait pas à produire des résultats répétitifs tout au long de la période d'évaluation. Les résultats obtenus démontraient également une grande variabilité inter-individus (telle que démontrée par le calcul du coefficient de variation). Malgré plusieurs jours de répétition, cette valeur de coefficient de variation est demeurée insuffisante dans l'optique de notre projet de recherche. Cette mesure réflexe a donc été écartée lors de la seconde phase du projet.

En contrepartie, les mesures cinétiques de distribution pondérale (SWB) et les mesures réflexes PTAE permettaient d'obtenir des résultats intéressants à la condition qu'une période d'acclimatation suffisante (entre une et deux semaines) soit initialement accordée. Malgré le

fait que l'ampleur de cet effet n'ait pas atteint celui précédemment établi chez l'espèce féline (Moreau, Guillot, et al., 2013), il semble que l'exercice améliore également la répétitivité de la distribution pondérale statique chez le rat. Le test opérant utilisé (paradigme du comportement d'échappement / évitement) de même que la performance sur le tapis d'exercice et le Rotarod ont aussi démontré de bons résultats en terme de répétitivité et ce, dès le début de leur utilisation. A notre connaissance, les résultats obtenus à l'aide du test opérant n'avaient jamais été démontrés sur des sujets sains. Bien qu'intuitivement suspectés de par sa nature d'animal albinos, il fut intéressant et essentiel de montrer la préférence de l'animal sain pour le côté sombre de l'appareil.

Comme mesure de dispersion inter-individus, nous avons également calculé et comparé les coefficients de variation de nos méthodes d'évaluation de la douleur. Ainsi, il apparut que la version dynamique de la méthode cinétique de distribution de la charge pondérale (DWB) est la plus intéressante. En effet, la variante dynamique de la distribution des charges pondérales est d'apparition assez récente. Cependant, plusieurs études ont démontré sa grande valeur dans la détection des changements liés aux conditions douloureuses (Dore-Savard et al., 2013; Robinson et al., 2012; Tetreault et al., 2013; Tetreault et al., 2011). De plus, par son habileté à détecter la distribution pondérale sur les quatre membres d'un animal non restreint, elle devient plus intéressante que la version statique qui n'offre qu'une mesure de ratio ipsi- / contra-latéral des membres postérieurs (Dore-Savard et al., 2013; Tetreault et al., 2011).

En deuxième portion de la première phase, ce coefficient de variation nous a aussi servi à déterminer l'horaire optimal d'un protocole d'acclimatation visant à réduire la variabilité

inter-individus. Il a été montré qu'un horaire sur deux semaines et comportant cinq périodes d'évaluation dont quatre la dernière semaine semblait répondre à ce critère (diminution du coefficient de variation). Cette période d'acclimatation qui pourrait sembler relativement longue semble adéquate pour permettre à l'animal de se familiariser à l'environnement du test et contribue sûrement également à permettre l'établissement de la routine d'évaluation de l'observateur.

La deuxième phase du projet de recherche visait à valider notre protocole d'évaluation de la douleur à l'aide du modèle MIA. Ainsi, la validité de notre protocole d'acclimatation, lorsqu'utilisé en prémisses de l'application d'un modèle d'arthrose connu, fut démontrée. Cette deuxième étape a aussi permis de montrer que notre protocole d'évaluation de la douleur (incluant SWB, PTAE, la performance au tapis d'exercice TNTC, et le test opérant PEAP) permet de détecter les changements douloureux associés à l'injection intra articulaire de MIA chez le rat. Malheureusement, lors de l'exécution de notre deuxième phase, la version dynamique du test de distribution pondérale n'était pas disponible. En effet, l'appareil étant relativement récent et ayant été généreusement prêté par un autre laboratoire lors de la phase 1, il ne fut pas disponible pour incorporation lors des travaux de la phase 2 de ce projet. De plus, le Rotarod ne permettait pas de détecter de changements associés à l'injection de MIA et a ainsi été écarté pour la suite de l'expérience.

L'utilisation d'un groupe d'animaux soumis à des traitements d'analgésie locale *via* l'injection intra-articulaire de lidocaïne et d'un groupe contrôle négatif (Sham) soumis à une injection intra-articulaire de saline physiologique a notamment permis de mettre en lumière certaines

subtilités dans l'obtention de résultats générés par nos tests et surtout de tester leur sensibilité à détecter une réponse analgésique.

En effet, dans le cadre de ce projet, il a été démontré que le PEAP demeure la méthode de détection de la douleur la plus valide puisque seul ce test a permis de montrer l'effet analgésique de l'injection intra-articulaire de la lidocaïne par un résultat significativement différent des groupes MIA et de contrôle Sham. D'autres études ont également démontré des résultats comparables à l'aide d'un autre test opérant (Okun et al., 2012). La détermination du seuil de retrait PTAE arrive deuxième, suivie par le tapis d'exercice TNTC. La distribution pondérale statique SWB n'a pas réussi à démontrer l'efficacité de l'analgésique.

Cette sensibilité accrue du test opérant sur une mesure réflexe (utilisant les filaments de Von Frey) a d'ailleurs été décrite dans une autre étude (Boyce-Rustay et al., 2010). Cette trouvaille pourrait confirmer l'affirmation que l'utilisation conjointe du paradigme du comportement d'échappement / évitement (PEAP) et de la détermination des seuils de retrait permet de distinguer l'effet d'un composé analgésique sur les aspects sensitifs et émotionnel de la douleur (Blackburn-Munro, 2004; Johansen, Fields, & Manning, 2001; LaBuda & Fuchs, 2000; Pedersen & Blackburn-Munro, 2006).

La distribution pondérale statique SWB n'a pas réussi à démontrer l'effet analgésique de l'injection intra-articulaire de lidocaïne. Il aurait été intéressant de vérifier si la version dynamique du même test, DWB, serait arrivée au même résultat. Une hypothèse visant à expliquer ce résultat serait qu'avec le modèle MIA, une fois la phase inflammatoire initiale

terminée, le test SWB est plus influencé par des changements mécaniques que par le processus douloureux. Ensuite, l'utilisation des filaments von Frey et du test opérant ont réussi à montrer un certain niveau d'hyperalgésie ou d'allodynie dans le groupe contrôle. Une pression intra-articulaire accrue ou encore l'apparition d'un certain niveau d'inflammation lié au traumatisme d'injection pourrait expliquer ce phénomène.

3.2 Réponses aux objectifs et hypothèses

Ce projet comportait deux phases distinctes qui visaient à : établir un protocole d'évaluation de la douleur permettant de couvrir les aspects sensori-discriminatif et émotivo-comportemental de la douleur chez le rat et valider la pertinence de ce protocole à l'aide d'un modèle d'arthrose reconnu.

Lors de la première phase, l'hypothèse visant à démontrer que le cycle circadien, l'influence de l'observateur ainsi que de l'exercice n'avait que peu d'effet sur la répétabilité des mesures a été démontré chez le rat normal. En second lieu, l'hypothèse de l'augmentation de la validité des résultats lorsqu'une période d'acclimatation adéquate est offerte aux animaux a également été vérifiée. Cette première phase nous a donc servi de prémisse pour permettre la conception d'un protocole d'évaluation de la douleur complet et fiable. En effet, notre protocole contient des mesures réflexes, des mesures de comportements innés et spontanées ainsi qu'un test opérant. Ce protocole a ensuite été validé à l'aide du modèle d'arthrose MIA.

Lors de cette seconde phase, notre hypothèse de départ s'est avérée partiellement fautive. En effet, bien que les changements nociceptifs liés à l'injection de MIA aient été démontrés par

tous les moyens d'évaluation de la douleur étudiés (sauf le Rotarod), seul le test opérant nous a permis de démontrer l'action analgésique de la lidocaïne. De plus, la détection d'un certain niveau d'hypersensibilité avec les animaux du groupe traité à la saline physiologique a permis de mettre en lumière l'effet non négligeable d'une injection intra-articulaire.

Avec du recul, on remarque que la douleur est une entité extrêmement complexe. Pour bien arriver à la cibler et surtout à la combattre, il importe d'avoir d'excellentes connaissances sur son origine, son mode de transmission et de perception, ainsi que sur les mécanismes de contrôle qui sont disponibles. La première étape consiste à faire l'identification précise du ou des types de douleur en place de façon à faire le choix d'une thérapie analgésique appropriée.

Malgré tout, l'identification du ou des types de douleur ne semble pas suffisante en soi. En effet, malgré toute la connaissance actuelle sur les différentes sources de douleur et leur transmission, tant au niveau animal qu'humain, il semble y avoir un important déficit de transfert de ces connaissances et découvertes précliniques vers la réussite du développement de nouveaux traitements efficaces contre la douleur humaine (Mao, 2009; Mogil, 2009; Yeziarski & Vierck, 2011).

3.3 Implication des résultats obtenus dans le contexte actuel de développement de nouveaux analgésiques

Actuellement, les groupes de recherche en pharmacologie et tout particulièrement dans le domaine de la douleur font face à de nombreux défis notamment en raison du contexte économique et du vieillissement accéléré de la population. Le coût faramineux du

développement de nouvelles thérapies ainsi que la complexité réglementaire grandissante viennent compliquer le processus mais d'autres facteurs sont également à prendre en compte.

3.3.1 Un déficit de translation du préclinique vers l'application clinique

Depuis de nombreuses années, peu de nouvelles stratégies thérapeutiques analgésiques efficaces ont vu le jour (Little & Hunter, 2013). On ne dispose pas de données précises dans le domaine mais, de manière générale, le nombre de nouveaux médicaments approuvés par milliard de dollars US dépensés en recherche et développement a diminué environ de moitié tous les 9 ans depuis 1950 (Palmer & Sundstrom, 2013). Le taux de succès dans le développement de nouvelles entités chimiques pour tous les domaines thérapeutiques fut environ de 11% en 2004 (Kola & Landis, 2004). Présenté autrement, cela correspondait à 1 composé en 9 testés. Ce taux de succès déjà plutôt limité ne correspond qu'aux composés ayant débuté les études de phase 1. Ce taux chute donc drastiquement lorsque toutes les étapes de développement de nouvelles molécules sont prises en compte. Les taux de succès varient considérablement avec le domaine: ex., environ 20% en cardiovasculaire, alors qu'oncologie présente un taux de succès d'environ 5% et neurologie de 8% (Kola & Landis, 2004). Si en 2001, les coûts de découverte et développement d'une nouvelle entité chimique étaient estimés à 804 millions US (DiMasi, Hansen, & Grabowski, 2003), ceux-ci atteignaient 900 million US en 2004 (Kola & Landis, 2004) pour dépasser de nos jours 1,3 milliard US (Palmer & Sundstrom, 2013). Il est évident que l'augmentation exponentielle des coûts liés à la recherche de même que l'augmentation de la complexité du processus réglementaire nuisent au développement de nouvelles approches analgésiques. Malgré cela, d'autres aspects

fondamentaux de la recherche sont responsables du faible taux de nouvelles stratégies thérapeutiques analgésiques.

Certaines molécules pourtant très prometteuses ont échoué le test des études cliniques (Hayes, Arendt-Nielsen, & Tate, 2014; Hill, 2000; Mogil et al., 2010). De plus, cette problématique semble d'avantage observée avec les pathologies engendrant de la douleur chronique, probablement en raison de sa complexité (Hayes et al., 2014; Mao, 2009). En excluant les résultats des études de toxicologie, un manque d'efficacité de la molécule testée semble être la cause principale de la raison de ces échecs (Berge, 2011; Kola & Landis, 2004), mais est-ce la seule raison ?

En prenant en compte le fait que cette douleur chronique engendre des coûts socio-économiques extrêmement importants et qu'elle est responsable de la diminution de la qualité de vie humaine autant qu'animale (Little & Hunter, 2013), on comprend mieux la préoccupation grandissante des chercheurs face à cette problématique. Alors que les connaissances mécanistiques sur la douleur n'ont jamais été aussi poussées, on recense une longue liste de nouveaux composés qui n'ont pas tenu leurs promesses générées des études précliniques sur les modèles expérimentaux animaux, à commencer par les antagonistes des récepteurs neurokinine 1 (ligand, la tachykinine substance P) (Hill, 2000), les antagonistes du récepteur à glycine (Wallace, Rowbotham, Katz, et al., 2002), les bloqueurs de canaux sodiques (Wallace, Rowbotham, Bennett, et al., 2002), ou encore l'ajout d'un antagoniste du récepteur *N*-méthyl-D-Aspartate (NMDA) à la morphine (Galer, Lee, Ma, Nagle, & Schlagheck, 2005). En 2010, on rapporte également des échecs en Phase 2 ou 3 de la

rafinamide (un bloqueur sodique $Na_v1.7$ et antagoniste *NMDA*) et de l'indantadol (un inhibiteur de la monoamine oxidase et antagoniste *NMDA*) (Mogil et al., 2010). Bien évidemment, les échecs en phase clinique peuvent provenir d'un défaut dans le design de l'essai clinique, dans la sélection de la population étudiée ou une faute dans son suivi, ou encore d'une découverte pharmacocinétique ou de toxicité non révélées au préalable sur l'animal. Mais la répétition de ces échecs successifs alors que le produit testé était très prometteur chez le rat ou la souris témoigne là encore d'un **déficit de validité translationnelle** : Plusieurs experts se sont penchés sur la question ; de façon générale, il semble que ce soit la pertinence clinique et la validité des modèles animaux et des méthodes d'évaluation de la douleur qui soient en cause (Blackburn-Munro, 2004; Mogil, 2009; Mogil & Crager, 2004; Vierck, Hansson, et al., 2008).

3.3.2 Validité du modèle animal de douleur

Dans un contexte de recherche pharmacologique, une fois les composés chimiques prometteurs sélectionnés, le défi premier repose sur l'utilisation d'un bon modèle animal et ensuite sur la pertinence des moyens d'évaluation de la douleur qui sont utilisés (Mao, 2009). En effet, il semble primordial d'utiliser un modèle qui comporte les mêmes caractéristiques physiopathologiques de la maladie humaine tant au niveau de son apparition que de son évolution dans le temps (Berge, 2011; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013). Des similarités au niveau anatomique et structurel sont aussi indiquées (Wendler & Wehling, 2010).

En raison du contexte économique actuel, on ne peut passer sous silence les considérations économiques liées au choix d'un modèle animal. En effet, l'utilisation de rongeurs de

laboratoire est très populaire dans le domaine des études portant sur la douleur. Ces animaux de petites tailles sont faciles à manipuler et à héberger à des coûts intéressants. La similarité de leur système nociceptif avec l'humain a aussi été établie. Toutefois, des animaux de plus grandes tailles sont généralement reconnus pour partager plus de similarités anatomiques avec l'humain (Gregory et al., 2012). Ceci a été confirmé dans une revue récente de données internes sur 10 ans accumulées dans l'arthrose canine et les auteurs rapportent une translationabilité incomparable des résultats obtenus sur modèle arthrosique canin (expérimental et/ou naturel) vers la condition clinique humaine (Moreau, Pelletier, et al., 2013). La technique utilisée pour reproduire et mesurer la condition douloureuse peut aussi être une source importante de l'augmentation des coûts et ainsi influencer le choix du chercheur.

Dans le cas de l'arthrose, la forme la plus courante de la maladie humaine et animale se déclare principalement de façon graduelle chez des sujets plutôt âgés ou à tout le moins vieillissants (Berge, 2011; Poole et al., 2010). Hors, la plupart des modèles animaux utilisés de nos jours impliquent de jeunes animaux et une lésion douloureuse d'apparition plutôt aigue (Little & Fosang, 2010; Poole et al., 2010). Pour autant, la recherche biomédicale en algologie ne peut se passer de ces modèles animaux (Mogil et al., 2010; Yezierski & Vierck, 2011). Cependant, le déficit de translation des résultats obtenus sur ces modèles vers la situation clinique vétérinaire ou humaine est trop important pour ne pas y voir une faiblesse majeure :

- 1) modèle trop artificiel, trop loin du mécanisme physiopathologique naturel ;
- 2) modèle éloigné de la réalité épidémiologique de la maladie (influences génétiques, du genre, du mode de vie, absence de comorbidité, *etc.*) ;
- 3) méthodes d'évaluation (hypersensibilité mécanique

ou thermique) impliquant seulement une réponse réflexe ; 4) ces mêmes méthodes sont des symptômes de prévalence, d'importance et de corrélation limitées avec la sévérité de douleur clinique ; 5) les designs expérimentaux utilisés sont de piètre qualité (étude non randomisée, non en aveugle, sans groupe contrôle, *etc.*). Ces faiblesses expliquent d'ailleurs la proposition que les meilleurs modèles animaux pourraient être ceux sur qui l'étiologie de la douleur est endogène (modèles naturels) et non pas induite artificiellement par l'expérimentateur (Mogil, 2009; Quessy, 2010). Des modèles naturels de douleur cancéreuse (ostéosarcome canin (Brown et al., 2005)) ou douleur neuropathique diabétique féline (Mizisin, Shelton, Burgers, Powell, & Cuddon, 2002), ou douleur arthrosique canine (Moreau, Pelletier, et al., 2013) et féline (Guillot et al., 2013) ont déjà démontré tout leur intérêt et potentiel. Cependant, ces modèles sont coûteux et nécessitent de longue période pour l'établissement de la pathologie étudiée ou sont difficilement accessibles. Leur rapport coûts / bénéfices est donc moins intéressant.

La sélection de notre modèle s'est d'abord basée sur les principes suivants : d'abord, les modèles chimiques sont reconnus pour produire rapidement des lésions douloureuses tout en ne nécessitant que peu de manipulations et peu de coûts (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013). Les modèles chimiques sont fréquemment utilisés avec les rongeurs, une espèce déjà reconnue pour sa facilité de manipulation à coût moindre. Bien que prisés pour évaluer l'efficacité analgésique de nouvelles entités chimiques ou biologiques, les modèles chimiques, de par leur concept, possèdent certains inconvénients. En effet, malgré la capacité des modèles chimiques à reproduire la douleur et à un certain point, la dégénérescence articulaire, le mécanisme physiopathologique responsable de l'établissement des lésions articulaires ne

correspond pas parfaitement au processus dégénératif retrouvé chez l'humain (Barve et al., 2007; Poole et al., 2010). Ainsi, les études visant à découvrir des traitements préventifs ou visant à intervenir sur des stades préliminaires de la pathologie humaine sont souvent décevantes lorsqu'elles font initialement appel à des modèles chimiques. Ces modèles sont toutefois utiles pour évaluer le potentiel analgésique d'un composé (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

Les modèles d'arthrose induits par l'exercice soutenue chez les rongeurs (Pap et al., 1998) pourraient représenter une alternative intéressante. Cependant, ces modèles ont été peu utilisés jusqu'à ce jour et nécessitent un plus grand effort de validation. Même lorsque comparés avec les modèles chirurgicaux (qui sont souvent le type le plus utilisé chez les plus grandes espèces), les modèles chimiques demeurent plus intéressants au niveau économique. En effet, bien que « désavantagés » de par l'épaisseur de leur cartilage articulaire et la taille des structures impliquées, les rats se prêtent également bien aux différentes techniques chirurgicales décrites (Gregory et al., 2012; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013). Les lésions articulaires engendrées par ces modèles sont reconnues pour être souvent sévères et d'apparition rapide suivant la procédure chirurgicale. Bien que ce type de modèle puisse être représentatif des cas humains d'arthrose liés à des blessures (souvent de type sportive), il est encore une fois d'une utilité discutable pour représenter les troubles de nature lentement progressive et menant à des états de douleur chronique. Leur utilité a toutefois été démontrée dans le développement de composés visant à soulager la douleur (Buvanendran, Kroin, Kari, & Tuman, 2008). Toutefois lorsque le but d'une étude est de démontrer l'effet analgésique d'un composé chez le rongeur, le modèle MIA demeure le plus populaire.

Le modèle MIA est généralement admis comme le modèle le plus pertinent parmi les modèles chimiques de par son action sur le cartilage articulaire (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013; Marker & Pomonis, 2012). Ce modèle est donc celui qui représente le mieux les changements articulaires et nociceptifs liés à la condition humaine. Une revue de la littérature récente a d'ailleurs mis en lumière sa grande popularité au sein des équipes de chercheurs. Il a d'ailleurs servi à démontrer l'action analgésique de différentes classes de composées depuis son apparition. Le tableau VI présenté en annexe offre un résumé intéressant de diverses publications ayant démontré l'efficacité du modèle MIA à détecter les changements douloureux et leur soulagement à l'aide de molécules analgésiques de diverses classes thérapeutiques. En effet, comme le modèle MIA, dans sa phase initiale, comporte une importante phase inflammatoire, il peut être utilisé pour démontrer l'action de diverses molécules ciblant les médiateurs de l'inflammation (Bove et al., 2003; Nagase et al., 2012; Pomonis et al., 2005). Cette propriété du modèle MIA est particulièrement intéressante lorsqu'on réalise que la plupart des traitements prescrits contre la douleur liée à l'arthrose humaine sont de la classe des anti-inflammatoires (Hayes et al., 2014). De plus, étant reconnu pour engendrer une douleur neuropathique et continue, le modèle MIA permet également de vérifier l'action de molécules analgésiques variées telles les opiacés, les inhibiteurs des canaux calciques ou sodiques, etc. (Combe et al., 2004; Fernihough et al., 2004; Nagase et al., 2012; Okun et al., 2012).

L'objectif de ce projet visait clairement à l'élaboration d'un protocole d'évaluation de la douleur valide et pertinent. Il était donc primordial de choisir un modèle permettant de premièrement mettre en évidence la douleur et ensuite démontrer son soulagement à l'aide de

molécules analgésiques. Notre choix s'est donc arrêté tout naturellement sur le modèle MIA. Les résultats obtenus lors de ce projet de même que ceux répertoriés dans le tableau VI présenté en annexe permettent de démontrer la capacité de ce modèle à représenter les composantes sensori-discriminative ainsi que émotivo-comportementale de la douleur tout comme l'efficacité analgésique de différentes classes de composés.

3.3.3 Le défi des méthodes d'évaluation de la douleur

Ayant établi ces faits, il apparaît utile, dans le but de pouvoir mieux comparer les différentes études sur la douleur, de mettre en place un document de référence proposant différents protocoles d'évaluation de la douleur selon le modèle utilisé. De cette façon, une certaine ressemblance entre les différents protocoles permettrait de mieux comparer l'efficacité de nouvelles molécules analgésiques par rapport aux autres et ainsi pourrait également contribuer à monter des banques de données de référence et ainsi permettre de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats dans les protocoles de recherche sur la douleur. De telles banques contribueraient grandement à faire diminuer les coûts de développement de nouveaux composés.

On comprend aisément le défi majeur que représente l'évaluation de la douleur chez l'animal comparativement à l'humain. Évidemment, les animaux ne peuvent répondre à des questions précises visant à quantifier le niveau de douleur ressenti ou de préciser l'amélioration de la qualité de vie perçue suite à l'ajout d'un traitement particulier. Cette difficulté est aussi décuplée lorsqu'on utilise des espèces proies, ces animaux ayant une tendance naturelle à cacher l'intensité de la douleur ressentie (Whittaker & Howarth, 2013).

Historiquement, les mesures réflexes ont été considérées comme la référence des outils d'évaluation de la douleur dans les modèles animaux. Ces mesures, faciles à obtenir et à reproduire, ont été et sont encore aujourd'hui utilisées dans une multitude de projets de recherche. Bien que pertinents pour évaluer la composante sensori-discriminative de la douleur, plusieurs voix se sont élevées pour dénoncer la validité de ces moyens d'évaluation dans l'optique du transfert des résultats vers la recherche clinique (Dolgin, 2010; Yeziarski & Vierck, 2011). En effet, on reconnaît aisément que les mesures réflexes ciblent les réponses impliquant la moelle épinière et le tronc cérébral et que la douleur est un phénomène plus complexe qui implique aussi des réponses du système limbique et du cortex (Mogil, 2009; Yeziarski & Vierck, 2011). Ces réponses réflexes nociceptives suite au stimuli thermique ou mécanique sont innées, elles ne requièrent pas un processus cérébral d'intensité sensorielle et ne sont pas dépendantes de l'expérience (ou apprentissage de la mémoire de la douleur) (Vierck, Hansson, et al., 2008).

Ainsi, pour espérer obtenir une réponse plus facilement transposable, il apparaît évident que les projets de recherche devraient inclure des moyens d'évaluation visant la détection de l'intervention des composants cognitifs et émotionnels d'un apprentissage et de processus supraspinaux (Mogil, 2009). Les résultats obtenus lors de ce projet supportent cette affirmation en démontrant la grande supériorité des tests opérants par rapport aux mesures réflexes à détecter l'action analgésique de la lidocaine.

En effet, les tests opérants sont plus à même de détecter les subtilités des composantes affectives ou émotionnelles de la douleur (Dolgin, 2010; Yeziarski & Vierck, 2011).

Cependant, ces tests ne sont pas parfaits. En effet, les tests opérants, requièrent que l'animal fasse un choix relativement à une situation douloureuse. Cette notion de choix nécessite une période d'apprentissage qui peut apporter un certain biais dans l'évaluation de la réponse surtout si on utilise des modèles représentant la condition naturelle de la maladie (*i.e.*, des animaux âgés). Il en va de même avec les mesures spontanées. Par exemple, les mesures cinétiques ou cinématiques pourraient être influencées par des composantes purement mécaniques menant à des valeurs faussement associées au phénomène douloureux. Cette hypothèse a d'ailleurs été soulevée lors de l'interprétation de nos résultats.

En résumé, le test idéal permettrait de révéler la transmission d'un signal nociceptif *via* les axes de transmission périphérique jusqu'au cortex tout en démontrant la traduction de ces influx en réaction complexe faisant intervenir les processus d'apprentissage aux douleurs passées (Vierck, Hansson, et al., 2008). Ce test devrait aussi être représentatif de la physiologie de la douleur humaine. Pour le moment, il semble pertinent d'utiliser une combinaison de différentes catégories de moyens d'évaluer la douleur de façon à obtenir une réponse plus complète et probablement plus facilement reproductible du côté de la recherche clinique (LaBuda & Fuchs, 2000; Pedersen & Blackburn-Munro, 2006). Ce projet de recherche propose donc une combinaison de mesures objectives comportant des tests reflexes, des mesures innées et spontanées ainsi qu'un test opérant.

3.4 Limites et perspectives futures de ce projet

Bien qu'ayant permis de répondre à plusieurs questions, le projet de recherche proposé comporte certaines limites qui nécessiteront d'autres étapes complémentaires pour être évaluées.

En effet, il a été démontré que la perception de la douleur peut être influencée par la composante hormonale d'un individu (Mogil, Chesler, Wilson, Juraska, & Sternberg, 2000; Vierck, Acosta-Rua, et al., 2008; Wiesenfeld-Hallin, 2005). Sachant cela, il a été décidé de se limiter à un genre en particulier lors des évaluations des 2 phases de ce projet afin de ne pas introduire une possibilité de biais lié au genre. Des essais préliminaires ont permis de déterminer que les rats de sexe femelle avaient une meilleure participation à l'exercice sur tapis roulant que les males. Leur tempérament motivé et curieux était donc plus adapté au type d'étude effectuée. Des phases subséquentes de validation de notre protocole d'évaluation de la douleur devront être faites sur des rats de sexe mâle de façon à assurer sa pertinence dans d'éventuelles études réglementaires qui requièrent souvent un ratio 50:50 de sujets de chaque sexe.

Ayant opté pour des méthodes objectives d'évaluation de la douleur, le genre de l'observateur n'est pas apparu être un critère significatif lors de la récolte de données. Nos résultats de la phase 1 semblent aussi indiquer que le niveau d'expérience de l'observateur ne semble pas avoir d'impact sur l'obtention de données valides. Cependant, nous sommes conscients que seulement deux observateurs ont été utilisés. Ce faible nombre pourrait diminuer la validité de

cette trouvaille et la répétition de certaines mesures avec plus d'observateurs différents pourrait être nécessaire.

Bien que fort prometteuse, la méthode d'évaluation de la distribution pondérale dynamique (DWB) n'ayant pu être utilisée lors de la deuxième phase de ce projet, il apparaît essentiel de poursuivre l'effort de validation de ce test inné/spontané à l'aide du modèle MIA puisque ses caractéristiques de répétabilité et de faible variabilité interindividuelle semblent constituer un atout non négligeable pour l'évaluation de la douleur.

La démonstration d'un certain niveau d'hypersensibilité au sein de notre groupe contrôle laisse croire que l'injection intra-articulaire de saline, elle-même, est responsable de la création d'un climat nociceptif pathologique. Ainsi, il apparaît essentiel d'inclure dans le protocole de futures études au moins un groupe contrôle sans injection intra-articulaire.

Récemment, la recherche semble s'intéresser à la découverte de nouveaux marqueurs spécifiques de la douleur (Ferreira-Gomes et al., 2012; Hayes et al., 2014; He, Guo, Xiao, He, & Zou, 2013). En effet, la nécessité d'obtenir un marqueur fiable pour quantifier la douleur et par le fait même le potentiel antalgique d'une nouvelle molécule tant chez les modèles humains que chez les animaux, permettrait d'augmenter la validité associée aux mesures réflexes lorsqu'utilisées seules et aux différents protocoles d'utilisation des tests présentement disponibles (Dolgin, 2010; Hayes et al., 2014; Mogil, 2009). Ces nouveaux marqueurs devront bien évidemment impliquer des processus visant à la fois les composantes sensori-

discriminative et émotive-comportementale de la douleur tel que le fait le protocole d'évaluation proposé dans ce projet.

Les systèmes nerveux central et périphérique semblent être la cible de ces nouvelles recherches. En effet, la découverte d'un neurotransmetteur spécifique aux voies de la douleur ou encore d'un nouveau récepteur induit par l'apparition de sensibilisation des fibres nociceptives permettrait le développement de nouveaux tests et modèles de façon à nous donner encore plus de moyens de combattre efficacement la douleur (Dolgin, 2010; Hayes et al., 2014). Certains chercheurs proposent également que, puisque la douleur est un phénomène cérébral, il serait judicieux d'utiliser des techniques d'imagerie médicale pour mesurer directement les réponses intégratives du cortex face aux phénomènes douloureux (Dolgin, 2010).

Conclusion

La recherche préclinique sur la douleur chronique souffre d'un important déficit de transfert des résultats vers la recherche clinique. C'est sous cette prémisse que s'est conçu et déroulé ce projet de Maîtrise. En effet, nous avons tenté de créer un protocole d'évaluation de la douleur arthrosique chez le rat qui respecte des objectifs de validité translationnelle vers la recherche clinique. Nous proposons un outil qui comporte une combinaison de moyens d'évaluation de la douleur (réflexe, spontané et opérant). Ces moyens de mesure ont d'abord été vérifiés pour déterminer l'influence de facteurs environnementaux et du manipulateur sur la répétitivité de leur mesure. Nous avons également fourni l'effort de vérifier quelle période d'acclimatation, lorsque associée à cette combinaison précise de tests d'évaluation, contribuera à obtenir des valeurs précises et optimales. Ces données ayant été obtenues sur des animaux normaux, nous avons finalement validé notre nouvel outil à l'aide d'un modèle d'arthrose chimique populaire chez le rat.

Pour faire suite aux résultats obtenus, la pertinence d'utiliser les tests opérants ne semble plus faire de doute. En effet, ceux-ci sont capable de démontrer l'implication de la composante émotive-comportementale dans la réponse à la douleur. Cependant, nous ne recommandons pas d'exclure toute autre forme de test (réflexes, spontanés) mais bien d'utiliser une combinaison de ceux-ci afin de couvrir tous les aspects de l'expérience douloureuse. Le protocole d'évaluation utilisé pour ce projet semble une option très intéressante. La pertinence de soumettre les animaux à une période adéquate d'acclimatation à l'environnement du test

permet également d'augmenter la validité des résultats obtenus. Bien que la création d'un protocole unique aidant à l'établissement d'une banque de données utilisée par toute la communauté scientifique peut sembler utopique, il serait idéal de viser à uniformiser les protocoles d'évaluation de la douleur de façon à faciliter la comparaison des différentes études entre-elles et ainsi réduire le nombre de sujets nécessaires lors des études précliniques.

Lors de l'utilisation du modèle MIA, il serait aussi judicieux d'inclure un groupe de contrôle neutre (sans injection intra-articulaire) et de porter une attention accrue à l'interprétation du test de distribution pondérale statique et aussi dynamique dont les qualités métrologiques sont très prometteuses.

Bibliographie

- Allen, K. D., Mata, B. A., Gabr, M. A., Huebner, J. L., Adams, S. B., Jr., Kraus, V. B., Schmitt, D. O., Setton, L. A. (2012). Kinematic and dynamic gait compensations resulting from knee instability in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 14(2), R78. doi: 10.1186/ar3801
- Anseloni, V. C., Ennis, M., & Lidow, M. S. (2003). Optimization of the mechanical nociceptive threshold testing with the Randall-Selitto assay. *Journal of Neuroscience Methods*, 131(1-2), 93-97.
- Appleton, C. T., McErlain, D. D., Pitelka, V., Schwartz, N., Bernier, S. M., Henry, J. L., Holdsworth, D. W., Beier, F. (2007). Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 9(1), R13. doi: 10.1186/ar2120
- Argoff, C. (2011). Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. *Current Medical Research and Opinion*, 27(10), 2019-2031. doi: 10.1185/03007995.2011.614934
- Baastrup, C., Jensen, T. S., & Finnerup, N. B. (2011). Pregabalin attenuates place escape/avoidance behavior in a rat model of spinal cord injury. *Brain Research*, 1370, 129-135. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.008
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041

- Minnerly, J. C., Weiss, D. J., Meyer, D. M., Aguiar, D. J., Sullivan, P. M., Weinrich, S. L., Head, R. D. (2007). Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(10), 1190-1198. doi: 10.1016/j.joca.2007.03.014
- Bauer, C. S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., Kadurin, I., Sri Ranjan, Y., Fernandez-Alacid, L., Millar N. S., Dickenson A. H., Lujan, R., Dolphin, A. C. (2009). The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. *The Journal of Neuroscience*, 29(13), 4076-4088. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0356-09.2009
- Beaulieu, P., & Rice, A. S. C. (2003). Applied physiology of nociception. In D. J. Rowbotham & P. E. Macintyre (Eds.), *Clinical pain management-Acute pain*. Arnold Publishers, London, 3-16
- Beckett, J., Jin, W., Schultz, M., Chen, A., Tolbert, D., Moed, B. R., & Zhang, Z. (2012). Excessive running induces cartilage degeneration in knee joints and alters gait of rats. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(10), 1604-1610. doi: 10.1002/jor.22124
- Bendele, A., McComb, J., Gould, T., McAbee, T., Sennello, G., Chlipala, E., & Guy, M. (1999). Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicologic Pathology*, 27(1), 134-142.
- Beraud, R., Moreau, M., & Lussier, B. (2010). Effect of exercise on kinetic gait analysis of dogs afflicted by osteoarthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 23(2), 87-92. doi: 10.3415/VCOT-09-06-0068
- Berge, O. G. (2011). Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1195-1206. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01300.x

- Besson, J. M. (1999). The neurobiology of pain. *The Lancet*, 353(9164), 1610-1615.
- Beyreuther, B. K., Geis, C., Stohr, T., & Sommer, C. (2007). Antihyperalgesic efficacy of lacosamide in a rat model for muscle pain induced by TNF. *Neuropharmacology*, 52(5), 1312-1317. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.01.012
- Bhattacharya, A., Wickenden, A. D., & Chaplan, S. R. (2009). Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics*, 6(4), 663-678. doi: 10.1016/j.nurt.2009.08.001
- Blackburn-Munro, G. (2004). Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(6), 299-305. doi: 10.1016/j.tips.2004.04.008
- Bogduk, M., & Merskey, H. (1994). Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage *Classification of Chronic Pain, Second Edition*. IASP Press, Seattle, 109
- Bolon, B., Campagnuolo, G., Zhu, L., Duryea, D., Zack, D., & Feige, U. (2004). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha produce distinct, time-dependent patterns of acute arthritis in the rat knee. *Veterinary Pathology*, 41(3), 235-243. doi: 10.1354/vp.41-3-235
- Boulanger, A. (2005). Approche et traitement de la douleur neuropathique. In P. Beaulieu (Ed.), *Pharmacologie de la douleur*. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 405-437
- Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A., Nargeot, J. (2005). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *The EMBO Journal*, 24(2), 315-324. doi: 10.1038/sj.emboj.7600515

- 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*(11), 821-830.
- Bowles, R. D., Mata, B. A., Bell, R. D., Mwangi, T. K., Huebner, J. L., Kraus, V. B., & Setton, L. A. (2013). In Vivo luminescent imaging of NF-kappaB activity and serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. doi: 10.1002/art.38279
- Boyce-Rustay, J. M., Zhong, C., Kohnken, R., Baker, S. J., Simler, G. H., Wensink, E. J., Honore, P. (2010). Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology*, *58*(2), 537-543. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.08.008
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*, *10*(4), 287-333. doi: 10.1016/j.ejpain.2005.06.009
- Brown, D. C., Iadarola, M. J., Perkowski, S. Z., Erin, H., Shofer, F., Laszlo, K. J., Olah, Z., Mannes, A. J. (2005). Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. *Anesthesiology*, *103*(5), 1052-1059.
- Bujalska, M., & Gumulka, W. S. (2001). Effect of cyclooxygenase and NO synthase inhibitors on antinociceptive action of acetaminophen. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, *53*(4), 341-350.
- Butler, S. H., Godefroy, F., Besson, J. M., & Weil-Fugazza, J. (1992). A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain*, *48*(1), 73-81.

- Buvanendran, A., Kroin, J. S., Kari, M. R., & Tuman, K. J. (2008). A new knee surgery model in rats to evaluate functional measures of postoperative pain. *Anesthesia and Analgesia*, *107*(1), 300-308. doi: 10.1213/ane.0b013e3181732f21
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, *57*(4), 411-425. doi: 10.1124/pr.57.4.5
- Centers for Disease Control & Prevention. (2013). Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation - United States, 2010-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *62*(44), 869-873
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, *53*(1), 55-63.
- Christgau, S., Tanko, L. B., Cloos, P. A., Mouritzen, U., Christiansen, C., Delaisse, J. M., & Hoegh-Andersen, P. (2004). Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor modulator (SERM). *Menopause*, *11*(5), 508-518.
- Cobos, E. J., Ghasemlou, N., Araldi, D., Segal, D., Duong, K., & Woolf, C. J. (2012). Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain*, *153*(4), 876-884. doi: 10.1016/j.pain.2012.01.016
- Colpaert, F. C., Tarayre, J. P., Alliaga, M., Bruins Slot, L. A., Attal, N., & Koek, W. (2001). Opiate self-administration as a measure of chronic nociceptive pain in arthritic rats. *Pain*, *91*(1-2), 33-45.

- Combe, R., Bramwell, S., & 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. doi: 10.1016/j.neulet.2004.08.023
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J. C., & Le Bars, D. (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72(5), 359-371. doi: 10.1016/j.jbspin.2004.01.010
- Creamer, P. (1997). Intra-articular corticosteroid injections in osteoarthritis: do they work and if so, how? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(11), 634-636.
- Cruz-Almeida, Y., & Fillingim, R. B. (2013). Can Quantitative Sensory Testing Move Us Closer to Mechanism-Based Pain Management? *Pain Medicine*, DOI: 10.1111/pme.12230. doi: 10.1111/pme.12230
- Datta, S., Chatterjee, K., Kline, R. H. t., & Wiley, R. G. (2010). Behavioral and anatomical characterization of the bilateral sciatic nerve chronic constriction (bCCI) injury: correlation of anatomic changes and responses to cold stimuli. *Molecular Pain*, 6, 7. doi: 10.1186/1744-8069-6-7
- Dickenson, A. H., & Chapman, V. (1997). Neurotransmetteurs et neuromodulateurs de la douleur au niveau spinal. In L. Brasseul, M. Chauvin & G. Guilbaud (Eds.), *Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleur aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques*. Édition Maloine, Paris, 39-45.
- Dieppe, P. A., & Lohmander, L. S. (2005). Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *The Lancet*, 365(9463), 965-973. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71086-2

- DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, 22(2), 151-185. doi: 10.1016/S0167-6296(02)00126-1
- Dixon, L. M., Sandilands, V., Bateson, M., Brocklehurst, S., Tolkamp, B. J., & D'Eath, R. B. (2013). Conditioned place preference or aversion as animal welfare assessment tools: Limitations in their application. *Applied Animal Behaviour Science*, 148(1-2), 164-176. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2013.07.012>
- Dolgin, E. (2010). Animalgesic effects. *Nature Medicine*, 16(11), 1237-1240. doi: 10.1038/nm1110-1237
- Dore-Savard, L., Beaudet, N., Tremblay, L., Xiao, Y., Lepage, M., & Sarret, P. (2013). A micro-imaging study linking bone cancer pain with tumor growth and bone resorption in a rat model. *Clinical and Experimental Metastasis*, 30(2), 225-236. doi: 10.1007/s10585-012-9530-0
- Dougherty, P. M., & Willis, W. D. (1991). Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain*, 47(1), 85-93.
- Eddy, N. B., & Leimbach, D. (1953). Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 107(3), 385-393.
- Edwards, R. R., Sarlani, E., Wesselmann, U., & Fillingim, R. B. (2005). Quantitative assessment of experimental pain perception: multiple domains of clinical relevance. *Pain*, 114(3), 315-319. doi: 10.1016/j.pain.2005.01.007

- Ferland, C. E., Laverty, S., Beaudry, F., & Vachon, P. (2011). Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(3), 603-610. doi: 10.1016/j.pbb.2010.11.003
- 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(1-2), 83-93. doi: 10.1016/j.pain.2004.08.004
- Ferreira-Gomes, J., Adaes, S., Sousa, R. M., Mendonca, M., & Castro-Lopes, J. M. (2012). Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. *Molecular Pain*, 8, 50. doi: 10.1186/1744-8069-8-50
- Field, H. L. (1989). *Douleur*. Medsi/Mcgraw-Hill, New York
- Fields, H. L. (1999). Pain: an unpleasant topic. *Pain, Supplement 6*, S61-69.
- Franciozi, C. E., Tarini, V. A., Reginato, R. D., Goncalves, P. R., Medeiros, V. P., Ferretti, M., Dreyfuss, J. L., Nader, H. B., Faloppa, F. (2013). Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. *Osteoarthritis Cartilage*, 21(7), 965-972. doi: 10.1016/j.joca.2013.04.007
- Fuchs, P. N., & McNabb, C. T. (2012). The place escape/avoidance paradigm: a novel method to assess nociceptive processing. *Journal of Integrative Neuroscience*, 11(1), 61-72. doi: 10.1142/S0219635212500045

- Gabriel, A. F., Marcus, M. A., Honig, W. M., Walenkamp, G. H., & Joosten, E. A. (2007). The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *163*(1), 9-16. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.02.003
- Galer, B. S., Lee, D., Ma, T., Nagle, B., & Schlagheck, T. G. (2005). Morphidex (morphine sulfate/dextromethorphan hydrobromide combination) in the treatment of chronic pain: three multicenter, randomized, double-blind, controlled clinical trials fail to demonstrate enhanced opioid analgesia or reduction in tolerance. *Pain*, *115*(3), 284-295. doi: 10.1016/j.pain.2005.03.004
- Giniès, P. (1999). Généralités. In L. Medical (Ed.), *Atlas de la Douleur. De la Douleur Imagée à la Prescription Commentée*. Houdé, Paris, 10.
- Gregory, M. H., Capito, N., Kuroki, K., Stoker, A. M., Cook, J. L., & Sherman, S. L. (2012). A review of translational animal models for knee osteoarthritis. *Arthritis*, *2012*, 764621. doi: 10.1155/2012/764621
- Grevenstein, J., Michiels, I., Arens-Corell, M., & Stofft, E. (1991). Cartilage changes in rats induced by papain and the influence of treatment with N-acetylglucosamine. *Acta Orthopaedica Belgica*, *57*(2), 157-161.
- Guillot, M., Moreau, M., Heit, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., & Troncy, E. (2013). Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *The Veterinary Journal*, *196*(3), 360-367. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.01.009

- 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 and Rheumatism*, *40*(9), 1670-1679. doi: 10.1002/1529-0131(199709)40:9<1670::AID-ART17>3.0.CO;2-W
- Guzman, R. E., Evans, M. G., Bove, S., Morenko, B., & 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.
- Haley, J., Ketchum, S., & Dickenson, A. (1990). Peripheral kappa-opioid modulation of the formalin response: an electrophysiological study in the rat. *European Journal of Pharmacology*, *191*(3), 437-446.
- Hameed, F., & Ihm, J. (2012). Injectable medications for osteoarthritis. *PM R*, *4*(5 Suppl), S75-81. doi: 10.1016/j.pmrj.2012.02.010
- Hamers, F. P., Lankhorst, A. J., van Laar, T. J., Veldhuis, W. B., & Gispen, W. H. (2001). Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *Journal of Neurotrauma*, *18*(2), 187-201. doi: 10.1089/08977150150502613
- Handwerker, H. O., Anton, F., & Reeh, P. W. (1987). Discharge patterns of afferent cutaneous nerve fibers from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation. *Experimental Brain Research*, *65*(3), 493-504.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, *32*(1), 77-88.

- Hayami, T., Pickarski, M., Zhuo, Y., Wesolowski, G. A., Rodan, G. A., & 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. doi: 10.1016/j.bone.2005.08.007
- Hayes, A. G., Arendt-Nielsen, L., & Tate, S. (2014). Multiple mechanisms have been tested in pain—how can we improve the chances of success? *Current Opinion in Pharmacology*, 14(0), 11-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.017>
- He, Z., Guo, Q., Xiao, M., He, C., & Zou, W. (2013). Intrathecal lentivirus-mediated transfer of interleukin-10 attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through modulation of spinal high-mobility group box 1 in rats. *Pain Physician*, 16(5), E615-625.
- Heilborn, U., Berge, O. G., Arborelius, L., & Brodin, E. (2007). Spontaneous nociceptive behaviour in female mice with Freund's complete adjuvant- and carrageenan-induced monoarthritis. *Brain Research*, 1143, 143-149. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.054
- Héon, L. (2005). Les modèles animaux de douleur. In P. Beaulieu (Ed.), *Pharmacologie de la douleur*. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 283-324.
- Hill, R. (2000). NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends in Pharmacologic Sciences*, 21(7), 244-246.
- Hinton, R., Moody, R. L., Davis, A. W., & Thomas, S. F. (2002). Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. *American Family Physician*, 65(5), 841-848.

- Hoegh-Andersen, P., Tanko, L. B., Andersen, T. L., Lundberg, C. V., Mo, J. A., Heegaard, A. M., Delaisse, J. M., Christgau, S. (2004). Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Research and Therapy*, 6(2), R169-180. doi: 10.1186/ar1152
- Hootman, J. M., & Helmick, C. G. (2006). Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis and Rheumatism*, 54(1), 226-229. doi: 10.1002/art.21562
- 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(3), 272-282. doi: 10.1016/j.pain.2006.12.022
- Jansen van't Land, C., & Hendriksen, C. F. (1995). Change in locomotor activity pattern in mice: a model for recognition of distress? *Lab Animal*, 29(3), 286-293.
- Janusz, M. J., Bendele, A. M., Brown, K. K., Taiwo, Y. O., Hsieh, L., & Heitmeyer, S. A. (2002). Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(10), 785-791.
- Johansen, J. P., Fields, H. L., & Manning, B. H. (2001). The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 98(14), 8077-8082. doi: 10.1073/pnas.141218998
- John, T. M., Brown, M. C., Wideman, L., & Brown, G. M. (1994). Melatonin replacement nullifies the effect of light-induced functional pinealectomy on nociceptive rhythm in the rat. *Physiology and Behavior*, 55(4), 735-739.

- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, *413*(6852), 203-210. doi: 10.1038/35093019
- Karahan, S., Kincaid, S. A., Kammermann, J. R., & Wright, J. C. (2001). Evaluation of the rat stifle joint after transection of the cranial cruciate ligament and partial medial meniscectomy. *Comparative Medicine*, *51*(6), 504-512.
- Kelly, S., Dunham, J. P., Murray, F., Read, S., Donaldson, L. F., & Lawson, S. N. (2012). Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive primary afferent neurones during MIA-induced osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*, *20*(4), 305-313. doi: 10.1016/j.joca.2012.01.002
- King, C. D., Devine, D. P., Vierck, C. J., Rodgers, J., & Yeziarski, R. P. (2003). Differential effects of stress on escape and reflex responses to nociceptive thermal stimuli in the rat. *Brain Research*, *987*(2), 214-222.
- King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T. W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H. L., & Porreca, F. (2009). Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, *12*, 1364-1366
- Kissin, I. (2010). The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesthesia & Analgesia*, *110*(3), 780-789. doi: 10.1213/ANE.0b013e3181cde882
- Kobayashi, K., Imaizumi, R., Sumichika, H., Tanaka, H., Goda, M., Fukunari, A., & Komatsu, H. (2003). Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, *65*(11), 1195-1199.

- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 711-715. doi: 10.1038/nrd1470
- LaBuda, C. J., & Fuchs, P. N. (2000). A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Experimental Neurology*, 163(2), 490-494. doi: 10.1006/exnr.2000.7395
- LaGraize, S. C., Labuda, C. J., Rutledge, M. A., Jackson, R. L., & Fuchs, P. N. (2004). Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain. *Experimental Neurology*, 188(1), 139-148. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.04.003
- Lampropoulou-Adamidou, K., Lelovas, P., Karadimas, E. V., Liakou, C., Triantafillopoulos, I. K., Dontas, I., & Papaioannou, N. A. (2013). Useful animal models for the research of osteoarthritis. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*. doi: 10.1007/s00590-013-1205-2
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralisch, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., van den Maagdenbers, A. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447-449. doi: 10.1038/nmeth.1455
- Lawrence, R. C., Felson, D. T., Helmick, C. G., Arnold, L. M., Choi, H., Deyo, R. A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M. C., Hunder, G. G., Jordan, J. M., Katz, J. N., Kremers, H. M., Wolfe, F., National Arthritis Data Workgroup. (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis and Rheumatism*, 58(1), 26-35. doi: 10.1002/art.23176

- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). [Acute pain measurement in animals. Part 1]. *Annales Française d' Anesthésie et de Réanimation*, 20(4), 347-365.
- Leach, M. C., Klaus, K., Miller, A. L., Scotto di Perrotolo, M., Sotocinal, S. G., & Flecknell, P. A. (2012). The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One*, 7(4), e35656. doi: 10.1371/journal.pone.0035656
- Li, J. X. (2013). The application of conditioning paradigms in the measurement of pain. *European Journal of Pharmacology*, 716(1-3), 158-168. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.03.002
- Little, C. B., & Fosang, A. J. (2010). Is cartilage matrix breakdown an appropriate therapeutic target in osteoarthritis--insights from studies of aggrecan and collagen proteolysis? *Current Drug Targets*, 11(5), 561-575.
- Little, C. B., & Hunter, D. J. (2013). Post-traumatic osteoarthritis: from mouse models to clinical trials. *Nat Review Rheumatology*, 9(8), 485-497. doi: 10.1038/nrrheum.2013.72
- Liu, P., Okun, A., Ren, J., Guo, R. C., Ossipov, M. H., Xie, J., King, T., Porreca, F. (2011). Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. *Neuroscience Letters*, 493(3), 72-75. doi: 10.1016/j.neulet.2011.01.027
- Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3), 473-477. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.025
- Luis-Delgado, O. E., Luis-Delgado, O. E., Barrot, M., Rodeau, J. L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freun-Mercier, M. J., Lasbennes, F. (2006). Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *The Journal of Pain*, 7(1), 32-39. doi: 10.1016/j.jpain.2005.07.011

- Malfait, A. M., & Schnitzer, T. J. (2013). Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nature Review Rheumatology*, *9*(11), 654-664. doi: 10.1038/nrrheum.2013.138
- Malfait, A. M., Tortorella, M., Thompson, J., Hills, R., Meyer, D. M., Jaffee, B. D., Chinn, K., Ghoreishi-Haack, N., Markosyan, S., Arner, E. C. (2009). Intra-articular injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat: an acute and reversible in vivo model of cartilage proteoglycan degradation. *Osteoarthritis Cartilage*, *17*(5), 627-635. doi: 10.1016/j.joca.2008.10.005
- Mao, J. (2009). Translational pain research: achievements and challenges. *The Journal of Pain*, *10*(10), 1001-1011. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.002
- Marchand, S. (2005). Neurophysiologie de la douleur. In P. Beaulieu (Ed.), *Pharmacologie de la douleur*. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 3-37.
- Marcinkiewicz, C. A., Green, M. K., Devine, D. P., Duarte, P., Vierck, C. J., & Yeziarski, R. P. (2009). Social defeat stress potentiates thermal sensitivity in operant models of pain processing. *Brain Research*, *1251*, 112-120. doi: 10.1016/j.brainres.2008.11.042
- Marker, C. L., & Pomonis, J. D. (2012). The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods in Molecular Biology*, *851*, 239-248. doi: 10.1007/978-1-61779-561-9_18
- Mauderli, A. P., Acosta-Rua, A., & Vierck, C. J. (2000). An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *97*(1), 19-29.
- McDougall, J. J. (2006). Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Research and Therapy*, *8*(6), 220. doi: 10.1186/ar2069

- McDougall, J. J., Bray, R. C., & Sharkey, K. A. (1997). Morphological and immunohistochemical examination of nerves in normal and injured collateral ligaments of rat, rabbit, and human knee joints. *Anatomical Record*, 248(1), 29-39.
- Miyagi, M., Ishikawa, T., Kamoda, H., Orita, S., Kuniyoshi, K., Ochiai, N., Kishida, S., Nakamura, J., Eguchi, Y., Arai, G., Suzuki, M., Aoki, Y., Toyone, T., Takahashi, K., Inoue, G., Ohtori, S. (2011). Assessment of gait in a rat model of myofascial inflammation using the CatWalk system. *Spine*, doi: 10.1097/BRS.0b013e3182269732
- Mizisin, A. P., Shelton, G. D., Burgers, M. L., Powell, H. C., & Cuddon, P. A. (2002). Neurological complications associated with spontaneously occurring feline diabetes mellitus. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(10), 872-884.
- Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4), 283-294. doi: 10.1038/nrn2606
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M., & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 24(3), 375-389.
- Mogil, J. S., & Crager, S. E. (2004). What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain*, 112(1-2), 12-15. doi: 10.1016/j.pain.2004.09.028
- Mogil, J. S., Davis, K. D., & Derbyshire, S. W. (2010). The necessity of animal models in pain research. *Pain*, 151(1), 12-17. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.015
- Mogil, J. S., Ritchie, J., Sotocinal, S. G., Smith, S. B., Croteau, S., Levitin, D. J., & Naumova, A. K. (2006). Screening for pain phenotypes: analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive assays. *Pain*, 126(1-3), 24-34. doi: 10.1016/j.pain.2006.06.004

- Moreau, M., Guillot, M., Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., & Troncy, E. (2013). Kinetic peak vertical force measurement in cats afflicted by coxarthrosis: data management and acquisition protocols. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 219-224. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.020
- Moreau, M., Pelletier, J. P., Lussier, B., d'Anjou, M. A., Blond, L., Pelletier, J. M., Del Castillo, J. R., Troncy, E. (2013). A Posteriori Comparison of Natural and Surgical Destabilization Models of Canine Osteoarthritis. *Biomed Research International*, 2013, 180453. doi: 10.1155/2013/180453
- Morgan, D., Carter, C. S., DuPree, J. P., Yeziarski, R. P., & Vierck, C. J., Jr. (2008). Evaluation of prescription opioids using operant-based pain measures in rats. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 16(5), 367-375. doi: 10.1037/a0013520
- Nagase, H., Kumakura, S., & Shimada, K. (2012). Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 65(1), 29-36. doi: 10.1016/j.vascn.2011.10.002
- Nakazato-Imasato, E., & Kurebayashi, Y. (2009). Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Science*, 84(17-18), 622-626. doi: 10.1016/j.lfs.2009.02.014
- Navratilova, E., Xie, J. Y., King, T., & Porreca, F. (2013). Evaluation of reward from pain relief. *Annals of the New York Academy of Science*, 1282, 1-11. doi: 10.1111/nyas.12095

- Negus, S. S., Vanderah, T. W., Brandt, M. R., Bilsky, E. J., Becerra, L., & Borsook, D. (2006). Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *319*(2), 507-514. doi: 10.1124/jpet.106.106377
- Neubert, J. K., Widmer, C. G., Malphurs, W., Rossi, H. L., Vierck, C. J., Jr., & Caudle, R. M. (2005). Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *Pain*, *116*(3), 386-395. doi: 10.1016/j.pain.2005.05.011
- Okun, A., Liu, P., Davis, P., Ren, J., Remeniuk, B., Brion, T., Ossipov, M. H., Xie, J., Dussor, G. O., King, T., Porreca, F. (2012). Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain*, *153*(4), 924-933. doi: 10.1016/j.pain.2012.01.022
- Orita, S., Ishikawa, T., Miyagi, M., Ochiai, N., Inoue, G., Eguchi, Y., Kamoda, H., Arai, G., Toyone, T., Aoki, Y., Kubo, T., Takahashi, K., Ohtori, S. (2011). Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskeletal Disorder*, *12*, 134. doi: 10.1186/1471-2474-12-134
- Palmer, A. M., & Sundstrom, L. (2013). Translational medicines research. *Drug Discovery Today*, *18*(11-12), 503-505. doi: 10.1016/j.drudis.2013.02.009
- Pap, G., Eberhardt, R., Sturmer, I., Machner, A., Schwarzberg, H., Roessner, A., & Neumann, W. (1998). Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. *Pathology Research and Practice*, *194*(1), 41-47. doi: 10.1016/S0344-0338(98)80010-1

- Parenti, C., Arico, G., Ronsisvalle, G., & Scoto, G. M. (2012). Supraspinal injection of Substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Peptides*, *34*(2), 412-418. doi: 10.1016/j.peptides.2012.01.016
- Pasternak, G. W. (2012). Preclinical pharmacology and opioid combinations. *Pain Medicine*, *13 Suppl 1*, S4-11. doi: 10.1111/j.1526-4637.2012.01335.x
- Pedersen, L. H., & Blackburn-Munro, G. (2006). Pharmacological characterisation of place escape/avoidance behaviour in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)*, *185*(2), 208-217. doi: 10.1007/s00213-005-0281-3
- Perissin, L., Facchin, P., & Porro, C. A. (2000). Diurnal variations in tonic pain reactions in mice. *Life Science*, *67*(12), 1477-1488.
- Pexton, T., Moeller-Bertram, T., Schilling, J. M., & Wallace, M. S. (2011). Targeting voltage-gated calcium channels for the treatment of neuropathic pain: a review of drug development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *20*(9), 1277-1284. doi: 10.1517/13543784.2011.600686
- 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*(3), 339-346. doi: 10.1016/j.pain.2004.11.008
- Poole, R., Blake, S., Buschmann, M., Goldring, S., Lavery, S., Lockwood, S., Matyas, J., MacDougall, J., Pritzker, K., Rudolphi, K., van den Berg, W., Yaksh, T. (2010). Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, *18 Suppl 3*, S10-16. doi: 10.1016/j.joca.2010.05.027

- Quessy, S. N. (2010). The challenges of translational research for analgesics: the state of knowledge needs upgrading and some uncomfortable deficiencies remain to be urgently addressed. *The Journal of Pain*, *11*(7), 698-700. doi: 10.1016/j.jpain.2010.05.001
- Rainville, P., Duncan, G. H., Price, D. D., Carrier, B., & Bushnell, M. C. (1997). Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*, *277*(5328), 968-971.
- Randall, L. O., & Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, *111*(4), 409-419.
- Robinson, I., Sargent, B., & Hatcher, J. P. (2012). Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of Freund's Complete Adjuvant induced hypersensitivity in mice. *Neuroscience Letters*, *524*(2), 107-110. doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.017
- Roizenblatt, S., Andersen, M. L., Bignotto, M., D'Almeida, V., Martins, P. J., & Tufik, S. (2010). Neonatal arthritis disturbs sleep and behaviour of adult rat offspring and their dams. *European Journal of Pain*, *14*(10), 985-991. doi: 10.1016/j.ejpain.2010.03.008
- Sakano, Y., Terada, N., Ueda, H., Fujii, Y., Hamada, Y., Akamatsu, N., & Ohno, S. (2000). Histological study of articular cartilage in experimental rat knee arthritis induced by intracapsular injection of cationic polyethyleneimine. *Medical Electron Microscopy Journal*, *33*(4), 246-257. doi: 10.1007/s007950000025
- Salo, P. T., Hogervorst, T., Seerattan, R. A., Rucker, D., & Bray, R. C. (2002). Selective joint denervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat. *Journal of Orthopaedic Research*, *20*(6), 1256-1264. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00045-1

- Salo, P. T., Seeratten, R. A., Erwin, W. M., & Bray, R. C. (2002). Evidence for a neuropathic contribution to the development of spontaneous knee osteoarthritis in a mouse model. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 73(1), 77-84. doi: 10.1080/000164702317281459
- Salo, P. T., & Tatton, W. G. (1993). Age-related loss of knee joint afferents in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 35(6), 664-677. doi: 10.1002/jnr.490350609
- Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological Reviews*, 89(2), 707-758. doi: 10.1152/physrev.00025.2008
- Santos-Nogueira, E., Redondo Castro, E., Mancuso, R., & Navarro, X. (2012). Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(5), 898-904. doi: 10.1089/neu.2010.1700
- Sauren, Y. M., Mieremet, R. H., Lafeber, F. P., Huber-Bruning, O., Groot, C. G., & Scherft, J. P. (1994). Changes in proteoglycans of ageing and osteoarthritic human articular cartilage: an electron microscopic study with polyethyleneimine. *The Anatomical Record*, 240(2), 208-216. doi: 10.1002/ar.1092400207
- Scott, I., Midha, A., Rashid, U., Ball, S., Walding, A., Kerry, P., Delaney, S., Cruwys, S. (2009). Correlation of gene and mediator expression with clinical endpoints in an acute interleukin-1beta-driven model of joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(6), 790-797. doi: 10.1016/j.joca.2008.09.016
- Silva, A., Andersen, M. L., & Tufik, S. (2008). Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain*, 140(3), 446-455. doi: 10.1016/j.pain.2008.09.025
- Sneddon, L. U. (2004). Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Review*, 46(2), 123-130. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.007

- Sufka, K. J. (1994). Conditioned place preference paradigm: a novel approach for analgesic drug assessment against chronic pain. *Pain*, *58*(3), 355-366.
- Suokas, A. K., Walsh, D. A., McWilliams, D. F., Condon, L., Moreton, B., Wylde, V., Arendt-Nielsen, L., Zhang, W. (2012). Quantitative sensory testing in painful osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*, *20*(10), 1075-1085. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.009
- Tal, M. (1999). A Role for Inflammation in Chronic Pain. *Current Review of Pain*, *3*(6), 440-446.
- Tang, T., Muneta, T., Ju, Y. J., Nimura, A., Miyazaki, K., Masuda, H., Mochizuki, T., Sekiya, I. (2008). Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Research and Therapy*, *10*(1), R13. doi: 10.1186/ar2363
- Tetreault, P., Beaudet, N., Perron, A., Belleville, K., Rene, A., Cavelier, F., Martinez, J., Stroh, T., Jacobi, A. M., Rose, S. D., Behlke, M. A., Sarret, P. (2013). Spinal NTS2 receptor activation reverses signs of neuropathic pain. *The FASEB Journal*, *27*(9), 3741-3752. doi: 10.1096/fj.12-225540
- Tetreault, P., Dansereau, M. A., Dore-Savard, L., Beaudet, N., & Sarret, P. (2011). Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiology and Behavior*, *104*(3), 495-502. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.015
- Thakur, M., Rahman, W., Hobbs, C., Dickenson, A. H., & Bennett, D. L. (2012). Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One*, *7*(3), e33730. doi: 10.1371/journal.pone.0033730

- Traub, R. J. (1996). The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. *Pain*, 67(1), 151-161.
- Troncy, E. (2013). Bienfaits de l'activité physique : Évidences expérimentales. In P. Beaulieu (Ed.), *Douleur en mouvement : actes du troisième Colloque francophone sur la douleur*. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, 17-26.
- Urban, R., Scherrer, G., Goulding, E. H., Tecott, L. H., & Basbaum, A. I. (2011). Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Pain*, 152(5), 990-1000. doi: 10.1016/j.pain.2010.12.003
- Vierck, C. J., Acosta-Rua, A., Nelligan, R., Tester, N., & Mauderli, A. (2002). Low dose systemic morphine attenuates operant escape but facilitates innate reflex responses to thermal stimulation. *The Journal of Pain*, 3(4), 309-319.
- Vierck, C. J., Acosta-Rua, A. J., Rossi, H. L., & Neubert, J. K. (2008). Sex differences in thermal pain sensitivity and sympathetic reactivity for two strains of rat. *The journal of Pain*, 9(8), 739-749. doi: 10.1016/j.jpain.2008.03.008
- Vierck, C. J., Hansson, P. T., & Yeziarski, R. P. (2008). Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain*, 135(1-2), 7-10. doi: 10.1016/j.pain.2007.12.008
- Vierck, C. J., Kline, R. H., & Wiley, R. G. (2003). Intrathecal substance p-saporin attenuates operant escape from nociceptive thermal stimuli. *Neuroscience*, 119(1), 223-232.

- Vierck, C. J., Kline, R. H., & Wiley, R. G. (2004). Comparison of operant escape and innate reflex responses to nociceptive skin temperatures produced by heat and cold stimulation of rats. *Behavioral Neuroscience, 118*(3), 627-635. doi: 10.1037/0735-7044.118.3.627
- Vonsy, J. L., Ghandehari, J., & Dickenson, A. H. (2009). Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. *European Journal of Pain, 13*(8), 786-793. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.09.008
- Vrinten, D. H., & 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.
- Wallace, M. S., Rowbotham, M., Bennett, G. J., Jensen, T. S., Pladna, R., & Quessy, S. (2002). A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled crossover evaluation of a short course of 4030W92 in patients with chronic neuropathic pain. *The Journal of Pain, 3*(3), 227-233.
- Wallace, M. S., Rowbotham, M. C., Katz, N. P., Dworkin, R. H., Dotson, R. M., Galer, B. S., Rauck, R. L., Backonja, M. M., Quessy, S. N., Meisner, P. D. (2002). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a glycine antagonist in neuropathic pain. *Neurology, 59*(11), 1694-1700.
- Weir, J. P. (2005). Quantifying test-retest reliability using the intraclass correlation coefficient and the SEM. *The Journal of Strength and Conditioning Research, 19*(1), 231-240. doi: 10.1519/15184.1

- Weiss, N., & De Waard, M. (2006). [Voltage-dependent calcium channels at the heart of pain perception]. *Médecine Science (Paris)*, 22(4), 396-404. doi: 10.1051/medsci/2006224396
- Wendler, A., & Wehling, M. (2010). The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Current Opinion of Pharmacology*, 10(5), 601-606. doi: 10.1016/j.coph.2010.05.009
- Whittaker, A. L., & Howarth, G. S. (2014). Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing? *Applied Animal Behaviour Science*.151, 1-12.
- Wiesenfeld-Hallin, Z. (2005). Sex differences in pain perception. *Gender Medicine*, 2(3), 137-145.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441-451.
- Woolf, C. J., & Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472), 1765-1769.
- Yaksh, T. L., Dirig, D. M., & Malmberg, A. B. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Investigation*, 16(7), 509-527.
- Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M. J., Barrot, M., & Poisbeau, P. (2009). Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *The Journal of Pain*, 10(7), 767-773. doi: 10.1016/j.jpain.2009.01.325

- Yeh, T. T., Wen, Z. H., Lee, H. S., Lee, C. H., Yang, Z., Jean, Y. H., Wu, S. S., Nimni, M. E., Han, B. (2008). Intra-articular injection of collagenase induced experimental osteoarthritis of the lumbar facet joint in rats. *European Spine Journal*, *17*(5), 734-742. doi: 10.1007/s00586-008-0594-0
- Yeziarski, R. P., & Vierck, C. J. (2011). Should the hot-plate test be reincarnated? *The Journal of Pain*, *12*(8), 936-937; author reply 938-939. doi: 10.1016/j.jpain.2011.05.003
- Zhang, X. J., Zhang, T. W., Hu, S. J., & Xu, H. (2011). Behavioral assessments of the aversive quality of pain in animals. *Neurosci Bulletin*, *27*(1), 61-67. doi: 10.1007/s12264-011-1035-3
- Zimmerman, M. (1986). Assessing pain in farm animals. In J. H. Duncan & V. Molony (Eds.), *Proceeding of the commission of european communities workshop* Luxembourg.
- Zuliani, V., Rivara, M., Fantini, M., & Costantino, G. (2010). Sodium channel blockers for neuropathic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *20*(6), 755-779. doi: 10.1517/13543771003774118
- Zweers, M. C., de Boer, T. N., van Roon, J., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P., & Mastbergen, S. C. (2011). Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, *13*(5), 239. doi: 10.1186/ar3437

Annexes

Table VI

Tableau récapitulatif des publications ayant démontré la validité du modèle MIA

| Publication | Doses utilisées | Jours de suivi | Méthodes d'évaluation | Réponses à l'analgésique |
|--|--|--|--|---|
| Bove <i>et al.</i>, 2003 | | | | |
| - <i>Mâles Wistar</i> (175–200 g) | 0,1, 0,3, 1 et 3 mg MIA (50 µL) n= 8 / groupe | 1, 3, 7, 14 | SWB - <i>Jours 3, 7, 14</i> | Dose : 1 mg MIA <i>Jour 14</i> Naproxène 1 mg/kg Acétaminophène 10 mg/kg Rofécoxib 10 mg/kg |
| Combe <i>et al.</i>, 2004 | | | | |
| - <i>Mâles Sprague Dawley</i> (125–175 g) | 2 mg MIA (25 µL) | 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 63, 70 | PTAE - <i>Jours 14-70</i> SWB - <i>Jours 7-70</i> | <i>Jour 14</i> Morphine - 1 mg/kg, SC - PTAE et SWB Tramadol - 10 mg/kg, PO - PTAE et SWB |

Fernihough et al.,**2004**

| | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---|---|
| - <i>Mâles Wistar</i> (220–340 g) | 2 mg MIA (25 µL) | Quotidiennement du jour 3 à 28 | SWB - <i>Jours 6-28</i> MHE - <i>Jours 5-28</i> PTAE - <i>Jours 5-28</i> | Diclofénac 30 mg/kg PO - MHE <i>Jour 3</i> Acétaminophène, 300 mg/kg PO - MHE <i>Jour 3</i> Morphine 6 mg/kg SC - MHE <i>Jours 3, 14 et 28</i> - PTAE <i>Jours 14, 28</i> Gabapentine 100 mg/kg PO - PTAE <i>Jour 14</i> |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---|---|

Pomonis et al., 2005

| | | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| - <i>Mâles, Sprague</i> <i>Dawley</i> (126–150 g) | 1 et 3 mg MIA (50 µL) | 1, 2, 4, 7, 11, 14, 17, 21, 28 | SWB - 3 mg MIA <i>jours 2, 4, 11, 21,</i> 28 - 1 mg MIA <i>jours 2, 4, 21, 28.</i> | Dose: 1 mg MIA Morphine 10 et 3 mg/kg SC - <i>Jour 21</i> Celecoxib 30 mg/kg PO BID du jour 12 à 21) - <i>Jour 21</i> |
|---|------------------------------|-----------------------------------|---|--|

Nagase et al., 2012

| | | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--|---|
| - Mâles Sprague Dawley (160–180 g) | 0,3, 1 et 3 mg MIA (50 µL) | Quotidiennement sur 28 jours | Mesure du niveau d'activité - 0,3 mg MIA jour 3 - 1 mg MIA jours 1 à 14 et 28 - 3 mg MIA jours 1 à 28 | Doses: 0,3, 1 et 3 mg MIA <u>Jour 28</u> Morphine 1 mg/kg SC Tramadol 30 mg/kg PO Acétaminophène 300 mg/kg PO |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--|---|

Okun et al., 2012

| | | | | |
|---|-------------------------------|---------|---|---|
| Mâles Sprague- Dawley (275–300 g) | 1, 3 et 4,8 mg (60 µL) | Jour 14 | SWB Stimulation plantaire thermique Conflit de renforcement | Dose: 4,8 mg MIA Jour 14 Lidocaïne IA 4% w/v, 200 µL - SWB - Conflit de renforcement Diclofénac 30 mg/kg, PO - SWB Antagoniste TRPV1 30 mg/kg, IP. Dose 4,8 mg MIA - Stimulation plantaire thermique |
|---|-------------------------------|---------|---|---|

Vonsy et al., 2009

| | | | | |
|--|-------------------------|-------------------------------------|--|---|
| <i>Mâles Sprague-Dawley</i> (120–140 g) | 2 mg MIA (25 µL) | Jours 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 | Hyperalgésie au froid - <i>jours 7 à 18</i> PTAE - <i>jours 2 et 11 à 14</i> Rotarod - <i>jours 2 et 4</i> | Administration chronique du jour 14 au jour 18 BID SC Morphine 3 mg/kg Hyperalgésie au froid - <i>jours 14, 15, 17, 18</i> PTAE - <i>jours 14 à 18</i> Gabapentine 30 mg/kg Hyperalgésie au froid - <i>jours 15 et 17</i> PTAE - <i>jours 17 et 18</i> Rotarod - <i>jour 16</i> |
|--|-------------------------|-------------------------------------|--|---|
