

## **RAPPORT FINAL**

# **DÉVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME PERMETTANT D'ÉVALUER LE POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE CONTRE L'OSTÉOARTHRITE, UNE MALADIE DÉGÉNÉRATIVE**

Projet de recherche réalisé par :

Céline Gagnon, Ph.D. Science pharmacie  
Esther Millette, Ph.D., Sciences pharmaceutiques  
Violette Mestre-Boivin, DEC, Santé animale  
Vincent Tellier, DEC, Santé animale  
Mireille Pilote, M.Sc., Biologie moléculaire

Pour :

**TRANSBIOTECH ET INNOVACTIV**

**PART 2010N053**

**JANVIER 2011 - JUIN 2012**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>INDEX DES FIGURES .....</b>	<b>3</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX.....</b>	<b>5</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>6</b>
1.1 L'ARTHROSE.....	6
1.2 MODÈLE ANIMAL D'ARTHROSE INDUIT PAR LE MIA.....	7
1.2.1 <i>Avantages de ce modèle animal .....</i>	<i>7</i>
1.2.2 <i>Évaluation des dommages aux articulations chez les animaux traités au MIA.....</i>	<i>7</i>
1.3 MÉDICAMENTS UTILISÉS POUR TRAITER L'ARTHROSE .....	9
<b>2 DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODOLOGIES D'INJECTION INTRA-ARTICULAIRE DE MIA, DE MESURE D'INCAPACITÉ ET DE DÉGÉNÉRESCENCE DU CARTILAGE .....</b>	<b>9</b>
2.1 MÉTHODOLOGIE DE L'INJECTION INTRA-ARTICULAIRE DE MIA .....	9
2.1.1 <i>Conclusion.....</i>	<i>10</i>
2.2 MÉTHODOLOGIE DE LA MESURE D'INCAPACITÉ .....	10
2.2.1 <i>Conclusion.....</i>	<i>12</i>
2.3 MÉTHODOLOGIE DE L'ANALYSE DE DÉGÉNÉRESCENCE DU CARTILAGE .....	12
2.3.1 <i>Résultats et discussion.....</i>	<i>13</i>
2.3.2 <i>Conclusion.....</i>	<i>15</i>
<b>3 DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE ANIMAL D'ARTHROSE PERMETTANT DE METTRE EN ÉVIDENCE L'EFFET ANALGÉSIQUE D'UN MÉDICAMENT DE RÉFÉRENCE. ....</b>	<b>15</b>
3.1 FORTE DOSE DE MIA .....	16
3.1.1 <i>Méthodologie .....</i>	<i>16</i>
3.1.2 <i>Résultats et discussion.....</i>	<i>18</i>
3.1.3 <i>Conclusion sur l'étude préliminaire effectuée avec la forte dose de MIA.....</i>	<i>21</i>
3.2 FAIBLE DOSE DE MIA .....	22
3.2.1 <i>Méthodologie .....</i>	<i>22</i>
3.2.2 <i>Résultats et discussion.....</i>	<i>23</i>
3.2.3 <i>Conclusion sur l'étude préliminaire effectuée avec la faible dose de MIA .....</i>	<i>27</i>
3.3 CONCLUSION SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MODÈLE ANIMAL D'ARTHROSE.....	27
<b>4 VALIDATION DE LA NOUVELLE PLATEFORME D'ARTHROSE À L'AIDE D'UN COMPOSÉ NATUREL NOVATEUR.....</b>	<b>27</b>
4.1 MODÈLE ANIMAL D'ARTHROSE.....	28
4.1.1 <i>Méthodologie .....</i>	<i>28</i>
4.1.2 <i>Résultats et discussion.....</i>	<i>30</i>
4.1.3 <i>Analyse du modèle animal d'arthrose et des outils de mesure développés .....</i>	<i>35</i>
4.1.4 <i>Conclusion sur le modèle animal d'arthrose et l'effet d'un médicament de référence. ....</i>	<i>38</i>
<b>5 RÉFÉRENCES .....</b>	<b>39</b>

## INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Coupes d'articulations de genoux de rats sains colorées au bleu de Toluidine. .....	13
Figure 2 : Suivi du poids corporel moyen de chaque groupe pendant l'étude préliminaire I.....	18
Figure 3 : Suivi de l'inflammation (mm) par micromètre pendant l'étude préliminaire I...	19
Figure 4 : Suivi de la douleur ressentie par mesure d'incapacité pendant l'étude préliminaire I.....	20
Figure 5: Coupes d'articulations de genoux de rats colorées au bleu de Toluidine chez des animaux traités ou non au MIA. ....	20
Figure 6 : Analyse de l'aire de cartilage au niveau du fémur et du tibia dans l'étude préliminaire I.....	21
Figure 7 : Suivi du poids corporel moyen de chaque groupe pendant l'étude préliminaire II.....	23
Figure 8 : Suivi de l'inflammation (mm) par micromètre pendant l'étude préliminaire II..	24
Figure 9 : Suivi de la douleur ressentie par mesure d'incapacité pendant l'étude préliminaire II.....	25
Figure 10: Coupes d'articulation de genoux de rats colorées au bleu de Toluidine chez des animaux traités ou non au MIA. ....	26
Figure 11 : Analyse de l'aire de cartilage au niveau du fémur et du tibia dans l'étude préliminaire II.....	26
Figure 12 : Poids corporel moyen de chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique.....	31
Figure 13 : Estimation de la nourriture consommée en moyenne par animal/jour pour chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique. ....	32
Figure 14 : Estimation de la dose quotidienne de 2010-RD02 et de nourriture prise en moyenne par les animaux de ce groupe pendant l'étude pharmacodynamique. .....	32
Figure 15 : Inflammation (mm) de l'articulation arthritique en moyenne pour chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique.....	33

---

Figure 16 : Distribution du poids corporel du côté droit par rapport au côté gauche (%) en moyenne pour chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique. ....34

Figure 17 : Suivi de l'inflammation (mm) de l'articulation arthritique selon la dose de MIA injectée dans le genou droit.....36

Figure 18 : Suivi de la distribution du poids corporel du côté droit par rapport au côté gauche (%) selon la dose de MIA injectée dans le genou droit.....36

Figure 19: Comparaison des aires de cartilage pour le fémur et le tibia du genou droit entre les études préliminaires I et II. ....38

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Système de pointage pour évaluer l'étendue de dégénérescence du cartilage. ....	8
Tableau 2: Nature des groupes de l'étude pharmacodynamique. ....	29

## 1 Introduction

Ce projet a été réalisé en partenariat avec InnoVactiv, une entreprise québécoise qui développe des molécules naturelles à usage thérapeutique pour la santé humaine et les commercialise afin d'améliorer la santé et la qualité de vie de la population. Selon certains résultats obtenus avec l'une de leur molécule testée dans des essais cellulaires, celle-ci présentait un potentiel anti-inflammatoire contre des médiateurs impliqués dans l'arthrose. Dans le but de répondre à leur besoin d'innovation, TransBIOTech (TBT) a proposé dans le cadre d'un projet PART de développer une plateforme qui allait permettre d'évaluer le potentiel thérapeutique de leur molécule contre cette pathologie. Ainsi, l'objectif ultime de ce projet était de vérifier le potentiel bénéfique d'un composé anti-inflammatoire, le 2010-RD02, contre les symptômes de l'arthrose. Afin à réaliser cet objectif, le projet global a été divisé en trois étapes, chacune de ces étapes correspondant à un objectif spécifique tel qu'énoncé plus bas. Dans un premier temps, nous nous sommes familiarisés avec les techniques requises pour induire l'arthrose chez le rat et les méthodes de mesure d'incapacité et de dommages à l'articulation. Dans un deuxième temps, le modèle animal a été développé suivant les méthodes mises au point à la première étape. Dans ce modèle, deux niveaux d'atteinte d'arthrose ont été comparés selon la dose de monoiodoacétate de sodium (MIA) administrée dans le genou. À cette étape de développement, un médicament de référence a été utilisé pour nous aider à déterminer le niveau d'arthrose qui favorise la mesure d'un effet bénéfique par le traitement de référence. Le composé 2010-RD02 a aussi été testé de façon préliminaire et nous avons évalué son effet sur l'incapacité et le niveau de dégénérescence du cartilage de l'articulation affligée. En toute fin de projet, une fois les conditions expérimentales et les méthodes de mesures optimisées, une étude pharmacodynamique a été réalisée pour valider notre modèle animal ainsi que pour déterminer l'efficacité du composé 2010-RD02 contre l'inflammation et la douleur liée à l'arthrose.

Les objectifs spécifiques du projet étaient les suivants :

- Développer les méthodologies d'injection intra-articulaire de MIA, de mesure d'incapacité et de dégénérescence du cartilage;
- Développer un modèle animal d'arthrose permettant de mettre en évidence l'effet analgésique d'un médicament de référence.
- Valider la nouvelle plateforme d'arthrose à l'aide d'un composé naturel novateur.

### 1.1 L'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage qui affecte plus de 10 % de la population globale au Canada. Ce pourcentage grimpe en flèche avec l'âge, passant de 60 % chez les personnes âgées de plus de 50 ans à 85 % chez celles de plus de 80 ans. L'arthrose est accompagnée de douleurs relativement intenses selon le niveau d'affectation des articulations. Elle réduit considérablement la qualité de vie et peut entraîner l'invalidité. Chez les patients atteints d'arthrose, les principaux dommages au cartilage sont de l'érosion, la diminution de l'épaisseur et l'apparition de fissures. Une diminution importante de la quantité de chondrocytes, principales cellules présentes dans le cartilage, est observée. Cette perte de chondrocytes est accompagnée de la perte de protéoglycane, puisque ce sont les chondrocytes qui sont responsables de sa

synthèse. Des changements au niveau des os, particulièrement l'os subchondral (partie de l'os sous le cartilage), sont aussi notés. Il y a aussi apparition, au niveau de l'articulation, d'ostéophytes (déformations du tissu osseux).

## **1.2 Modèle animal d'arthrose induit par le MIA**

### **1.2.1 Avantages de ce modèle animal**

Un modèle animal souvent utilisé pour étudier l'arthrose est celui dont la dégénérescence du cartilage du genou est induite par injection de MIA dans l'articulation de l'une des pattes postérieures chez le rat. Le genou constitue l'une des articulations souvent atteinte d'arthrose chez l'humain. Le MIA est un agent qui inhibe l'activité de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase au niveau des chondrocytes. Ceci amène l'arrêt de la glycolyse, ce qui entraîne la mort des chondrocytes et résulte en la dégénérescence du cartilage (Kalbhen 1987).

Le modèle d'arthrose induit par MIA a pour avantage de refléter la pathologie observée chez l'humain à plusieurs égards. D'une part, l'arthrose est généralement le résultat de l'usure de l'articulation liée à des stress biomécaniques qui ont été subis au cours de la vie. Ces stress biomécaniques génèrent une réponse inflammatoire aiguë et transitoire. Ceci est combiné à un désordre métabolique apparaissant davantage avec l'âge qui favorise la dégénérescence du cartilage au détriment de sa régénérescence. L'injection de MIA reproduit à la fois un traumatisme causé à l'articulation, la réponse inflammatoire transitoire, ainsi que la dégénérescence du cartilage lié à la mort de chondrocytes. Par ailleurs, l'une des raisons pour laquelle cette pathologie demeure sans traitement est la difficulté à favoriser une régénérescence du cartilage affecté. D'autre part, l'effet de dégénérescence causé par le MIA et le niveau de douleur quantifié semblent proportionnels à la dose administrée (Bove et al. 2003; Pomonis et al. 2005). Ceci permet de mimer différents niveaux d'atteinte de la maladie, tel qu'observé dans la pathologie humaine. De façon similaire, le niveau de dégénérescence du cartilage et le processus inflammatoire sont souvent liés à la douleur ressentie par le patient souffrant d'arthrose. Considérant que la douleur est l'un des principaux facteurs invalidants chez les personnes atteintes d'arthrose, le modèle MIA, qui reproduit non seulement la dégénérescence du cartilage mais également la douleur associée à cette maladie, représente un des modèles les plus pertinents pour tester l'efficacité thérapeutique d'un composé bioactif pour cette maladie.

Ce modèle animal présente aussi l'avantage de n'affecter qu'une seule articulation sur laquelle repose le poids corporel de l'animal. Ceci permet à l'animal de se déplacer, de se nourrir et surtout de limiter sa souffrance. Un modèle comme celui de l'arthrite rhumatoïde est plutôt généralisé et affecte plusieurs articulations, ce qui, nous l'avons constaté par le passé (PART2006N032), a des effets majeurs sur l'état de santé général de l'animal. Suivant la réglementation établie par le Conseil canadien de la protection des animaux (CCPA), ce modèle animal d'arthrose répond à la fois aux normes du CCPA et est très pertinent pour la recherche appliquée en santé.

### **1.2.2 Évaluation des dommages aux articulations chez les animaux traités au MIA**

Au niveau des articulations atteintes d'arthrose induite par le MIA, on observe une perte importante de chondrocytes dans le cartilage et cette perte de chondrocytes est accompagnée par la perte de protéoglycane. La perte de chondrocytes au niveau du cartilage est donc généralement évaluée en mesurant la perte de protéoglycane. Ce qui

nous permet d'évaluer les dommages causés à l'articulation par la maladie. Les deux colorants les plus utilisés pour colorer le protéoglycane sur les coupes d'articulations sont le bleu de Toluidine et la safranine-vert lumière. Ces colorants cationiques réagissent chimiquement avec le protéoglycane et les glycoaminoglycanes du cartilage et l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de protéoglycane. Le bleu de Toluidine provoque une coloration plus intense que la safranine-vert lumière, puisqu'il a une plus grande affinité pour le soufre contenu dans le cartilage (Camplejohn & Allard 1988). Quoique la coloration à la safranine-vert lumière est proportionnelle à la quantité de protéoglycane dans le cartilage normal, certaines études indiquent que ce colorant n'est pas un indicateur sensible dans les cartilages dans lesquels les glycoaminoglycanes sont diminués (Camplejohn & Allard 1988), comme c'est le cas dans les articulations souffrant d'arthrose. Malgré tout, la safranine-vert lumière semble être un colorant très souvent utilisé pour mesurer la quantité de protéoglycane au niveau du cartilage. C'est pourquoi lors de la mise au point des techniques de coloration du cartilage, nous avons testé ces deux types de colorants.

Après coloration des coupes d'articulation, il est ensuite possible d'évaluer les dommages causés par le MIA sur l'articulation. La société internationale de recherche en arthrose a publié, récemment, des recommandations concernant les paramètres histologiques à évaluer chez les modèles animaux dont l'arthrose a été induite chimiquement ou par chirurgie (Gerwin et al. 2010). Ces paramètres sont les suivants pour le modèle animal chez le rat : perte de la matrice du cartilage, indice de dégénérescence du cartilage, mesure de la largeur totale endommagée du cartilage, profondeur de lésion du cartilage, largeur des ostéophytes, indice de dommages à l'os subchondral et au cartilage calcifié, description de l'état de la membrane synoviale, mesure de l'épaisseur de la capsule médiale de l'articulation et, finalement, mesure de l'épaisseur de la plaque de croissance. Chez les modèles animaux dont l'arthrose est induite par le MIA, ce sont généralement les dommages induits au cartilage qui sont évalués et qui nous permettent d'estimer l'état de l'articulation. C'est le cartilage de la zone médiale du plateau tibial qui est généralement atteint en premier des symptômes de l'arthrose. Une perte importante des chondrocytes et de protéoglycane est observée dans ce tissu. Après coloration des coupes d'articulation avec le bleu de Toluidine ou la safranine-vert lumière, cette perte de chondrocytes peut être évaluée en utilisant une échelle semi-quantitative qui peut prendre la forme suivante :

**Tableau 1 : Système de pointage pour évaluer l'étendue de dégénérescence du cartilage.**

Pointage	Caractéristiques histologiques
0	Aucun dommage
1	Dommages mineurs : 5-10% du cartilage est affecté
2	Dommages modérés : 11-25% du cartilage est affecté
3	Dommages moyens : 26-50% du cartilage est affecté
4	Dommages marqués : 51-75% du cartilage est affecté
5	Dommages sévères : plus de 75% du cartilage est affecté

Des mesures de la largeur et de l'épaisseur du cartilage dégénéré peuvent aussi être faites pour compléter la caractérisation du cartilage affecté. Finalement, l'évaluation de l'intensité de dégénérescence de l'articulation peut être complétée en mesurant un indice de dommages à l'os subchondral et au cartilage calcifié selon une échelle semi-quantitative de 0 à 5, le chiffre 5 représentant les dommages les plus marqués.

### **1.3 Médicaments utilisés pour traiter l'arthrose**

La médication traditionnelle utilisée pour traiter les patients permet uniquement de soulager la douleur, soit par l'usage d'anti-inflammatoires ou encore d'analgésiques. Pour les cas sévères d'arthrose, des dérivés opiacés sont aussi utilisés. Dans les deux cas, ces médicaments entraînent des effets indésirables importants, sans compter que les anti-inflammatoires ne procurent souvent qu'un soulagement partiel de la douleur ostéoarthritique. La médecine alternative propose l'usage de produits naturels, telles la chondroïtine et la glucosamine. Selon des études cliniques, ceux-ci semblent ralentir la progression de l'arthrose (Black et al. 2009) mais d'autres études contredisent cet effet (Baime 2006; Clegg et al. 2006). De plus, l'observance thérapeutique des gens prenant ces suppléments naturels est relativement faible en raison de la nécessité de respecter la posologie pendant plus de quatre à six semaines avant d'en ressentir les bénéfices potentiels.

## **2 Développement des méthodologies d'injection intra-articulaire de MIA, de mesure d'incapacité et de dégénérescence du cartilage**

Dans le cadre d'une étude pilote, nous avons développé la méthode d'injection intra-articulaire de MIA avec un petit groupe de rongeurs, pour s'assurer de bien maîtriser la méthode à l'étape subséquente qui comporte un plus grand nombre d'animaux. Lors de cette première étape, nous nous sommes familiarisés également avec l'appareil de mesure du test d'incapacité avec les quelques animaux mentionnés. Nous avons établi aussi un protocole pour la mise en œuvre de ce test fonctionnel; par exemple, le temps d'acclimatation requis de l'animal dans l'habitacle pour obtenir des valeurs stables, le positionnement de l'animal lors de la prise de données, etc. À la fin de cette étude préliminaire, qui a eu une durée de 21 jours, les articulations d'intérêt ont été collectées, préparées pour être mises sur lames histologiques et colorées pour effectuer les premières analyses histopathologiques en microscopie optique. Cette étape préliminaire était importante pour le développement du modèle d'arthrose en soit mais, de plus, elle permettait de former le personnel aux différentes manipulations. Par ailleurs, l'effet du MIA a pu être évalué grossièrement grâce aux mesures de test d'incapacité et des coupes histologiques du genou effectuées à partir du petit nombre de rats utilisés à cette étape.

Pour l'ensemble des méthodologies développées dans cette première étape du projet, cinq rats Sprague-Dawley ont été utilisés. Tel que décrit dans les sections 2.1, 2.2 et 2.3, ces animaux ont permis 1- d'optimiser la méthodologie de l'injection intra-articulaire de MIA; 2- de mettre en pratique la mesure d'incapacité et d'inflammation, permettant d'apporter des améliorations pour obtenir des mesures les plus précises et reproductibles possible; 3- optimiser la méthodologie de prélèvement des articulations et développer la méthode d'analyse de dégénérescence du cartilage.

### **2.1 Méthodologie de l'injection intra-articulaire de MIA**

Dans le but de développer la méthode d'injection de MIA et de saline au niveau du genou, nous nous sommes basés sur la méthodologie décrite dans l'article de Bove (Bove et al. 2003). Dans une première étape, nous avons eu recours à quelques cadavres de rats qui avaient été utilisés dans un projet précédent pour analyser l'angle d'injection de la solution permettant d'administrer la solution sous la rotule, dans la capsule articulaire. Par la suite, l'injection d'une solution d'hématoxyline a été pratiquée

sur quelques cadavres pour vérifier si, selon l'angle d'injection, la solution colorée se retrouvait dans l'espace de la capsule articulaire. Cette réutilisation de cadavres d'animaux répond à une des règles du CCPA qui favorise la réduction de l'utilisation d'animaux de laboratoire. En mettant au point la technique d'injection sans même utiliser des animaux de laboratoire vivants, on s'assurait que la méthode allait être optimisée très rapidement sans nécessiter l'utilisation d'un grand nombre d'animaux.

La méthode d'injection intra-articulaire (i.a.) a par la suite été appliquée sur cinq rats Sprague-Dawley de 175-200 g (Charles River, Saint-Constant). Le distributeur (PB600-1) qui a été utilisé pour l'injection de saline ou de MIA est un distributeur automatique sur lequel est installée la seringue de verre (1002TLL de Hamilton) de 2,5 ml. De cette façon, un volume précis de 50 µL est injecté à chaque utilisation. Un test de répétabilité a été fait pour vérifier le volume fourni à chaque « application » sur le distributeur pour s'assurer que le volume variait peu. Une variation du volume entre chaque administration pourrait avoir un impact important sur la dose finale de MIA puisque la solution est relativement concentrée pour être administrée dans un si petit volume. Lors de l'injection de saline (genou gauche) ou de MIA (genou droit) chez ces animaux, la méthode décrite par le groupe de Bove a été mise en pratique. Cette méthode, appelée crânio-dorsale, consiste à faire l'injection à travers le tendon patellaire, sous la rotule. Lors de l'application de cette méthode sur les animaux, quelques ajustements ont dû être apportés pour éviter qu'il y ait la formation d'hématome au site d'injection. En effet, la formation d'hématome est survenue sur le premier animal, ce qui a affecté les mesures d'inflammation et d'incapacité. Cet animal recevait de la saline dans les deux genoux (contrôle sain, sans arthrose) et les mesures d'inflammation et d'incapacité suggéraient une affectation importante au genou gauche, étant celui qui présentait un hématome. Sur les quatre rats suivants, l'injection i.a. de saline dans le genou gauche et de MIA (2 mg) dans le genou droit a permis d'obtenir des résultats de mesure de l'inflammation et d'incapacité pertinents et consistants avec la littérature. Ces mesures ne sont pas présentées dans le rapport puisque la méthodologie de ces mesures était développée en parallèle.

### **2.1.1 Conclusion**

Une procédure standardisée décrivant la méthode d'injection de MIA dans le genou de rats a été produite en cours de projet. Cette procédure a été réalisée sous anesthésie générale à l'isoflurane, suivant la procédure normalisée de fonctionnement (PNF) établie par le comité de protection des animaux (CPA) du Cégep de Lévis-Lauzon. La procédure d'injection de saline et de MIA a été appliquée dans les étapes ultérieures du projet, lors du développement du modèle animal, et a permis d'entraîner de façon relativement constante de l'arthrose dans le genou droit, à différents degrés de sévérité selon la dose de MIA, tel que présenté dans les sections 3 et 4 du rapport.

## **2.2 Méthodologie de la mesure d'incapacité**

Le test d'incapacité consiste à mesurer la répartition du poids corporel sur les deux pattes postérieures de l'animal. Considérant que le MIA est injecté dans l'un des deux genoux de l'animal, le pourcentage du poids corporel se répartit majoritairement du côté sain (70 %), comparativement au peu de poids qui est mis du côté atteint d'arthrose (30 %) (Fernihough et al. 2004; Pomonis et al. 2005). La répartition du poids corporel est relativement équilibrée (50 %) entre les deux pattes postérieures lorsque celles-ci sont saines. Parallèlement, lorsqu'un composé thérapeutique permet de réduire la douleur ressentie sur l'articulation affectée et/ou d'améliorer le niveau d'arthrose, la répartition

du poids corporel sur les deux pattes postérieures devient plus équilibrée (près de 50 % pour chacune) que sans traitement. Le niveau d'amélioration apporté par le composé thérapeutique est ainsi quantifié aisément, sans biais ou évaluation subjective.

La mesure de la distribution du poids corporel supporté par les pattes postérieures se fait à l'aide d'un appareil spécialisé de mesure d'incapacité. Cet appareil est constitué de trois composantes: un contenant transparent dans lequel l'animal est déposé qui restreint son déplacement et qui favorise une position verticale. Deux balances, sous forme de plaques, sont situées au plancher de ce contenant. Sur l'une de ces balances est positionnée la patte postérieure droite de l'animal et sur l'autre repose la patte postérieure gauche, permettant ainsi de distinguer le poids qui est supporté par chacune des pattes postérieures. Une unité de contrôle est reliée aux balances et permet d'intégrer le poids appliqué sur chaque balance. Ainsi, le pourcentage du poids mis sur une patte affectée par l'arthrose par rapport à l'autre qui est saine permet de quantifier le niveau d'incapacité de la patte atteinte d'arthrose. Cette méthode reflète bien d'ailleurs la détérioration de la qualité de vie d'un patient souffrant d'arthrose, puisque celui-ci ne peut utiliser un membre dont l'articulation est douloureuse au moindre effort accompli via cette articulation. L'avantage de cette méthode est précisément qu'elle fournit une indication quantitative de la douleur et de la capacité d'utiliser l'articulation atteinte d'arthrose.

Lors des premiers essais de mesure d'incapacité, les animaux bougeaient énormément et étaient peu coopérants. Comme la plupart des appareils de mesure utilisés sur des animaux éveillés, l'appareil de mesure d'incapacité fournit de meilleurs résultats lorsque les animaux y sont acclimatés. De ce fait, nous avons habitué les animaux à rester dans l'habitable pendant 5 à 10 minutes, deux à trois fois par semaine. Après chaque séance d'acclimatation et les mesures d'incapacité, les animaux recevaient une petite sucrerie aux fruits (F5136, Bio-Serv), les récompensant de leur coopération. Cette méthode d'acclimatation peut être privilégiée pour le modèle d'arthrose puisque la glycémie, l'insulinémie ou le contrôle du poids corporel ne sont pas des paramètres de mesures importants du modèle animal utilisé.

Pour chaque essai, les animaux devaient être installés sur les deux balances de part égale en s'assurant que la queue et les organes masculins ne soient pas déposés davantage sur un côté par rapport à l'autre. À l'aide d'une spatule, les pattes étaient déplacées sur la balance et la mesure était prise lorsqu'on jugeait que l'animal était calme et bien installé sur chacune des balances. En début de mise au point, la mesure était prise sur une durée de cinq secondes ou de dix secondes. Rapidement nous avons constaté que la mesure prise sur dix secondes, obligeant l'immobilité de l'animal sur toute la durée de la mesure, était trop longue pour que l'animal reste immobile. Nous avons rapidement opté pour la prise de mesure sur une durée de cinq secondes. La mesure d'incapacité prise sur un intervalle de 5 secondes ou moins est d'ailleurs privilégiée par d'autres groupes de recherche (Bove et al. 2003; Pomonis et al. 2005; Strassle et al.). Plusieurs mesures doivent être prises pour chaque animal, à chaque temps donné. L'étude pilote a par ailleurs permis d'établir la cinétique de l'inflammation et de la douleur. Les mesures d'incapacité et d'inflammation suggéraient une affectation plus sévère du genou droit les trois premiers jours suivant l'injection de MIA. Cette affectation se résorbait considérablement à partir du jour 7 et ce, jusqu'à la fin de l'étude, soit 21 jours après l'injection, selon les mêmes mesures. Une affectation plus sévère de l'articulation atteinte d'arthrose par injection de MIA lors des premiers jours

est bien décrite dans la littérature (Bove et al. 2003; Fernihough et al. 2004; Pomonis et al. 2005).

### **2.2.1 Conclusion**

La mesure d'incapacité a été mise en application et optimisée lors de l'étude pilote. Avant les premières mesures, une acclimatation des animaux dans l'habitacle de l'appareil était requise pour obtenir des mesures fiables et reproductibles. Cette acclimatation était effectuée sur une période de 5-10 minutes, deux à trois fois par semaine. Une fois les animaux acclimatés, trois à cinq mesures par essai devaient être prises par animal pour ensuite calculer la moyenne d'incapacité de chaque individu.

La méthode de mesure d'incapacité a été appliquée dans les étapes ultérieures du projet, lors du développement du modèle animal. Tel que présentée dans les sections 3 et 4 du rapport, cette méthode a permis d'obtenir des valeurs d'incapacité relatives à la dose de MIA injectée.

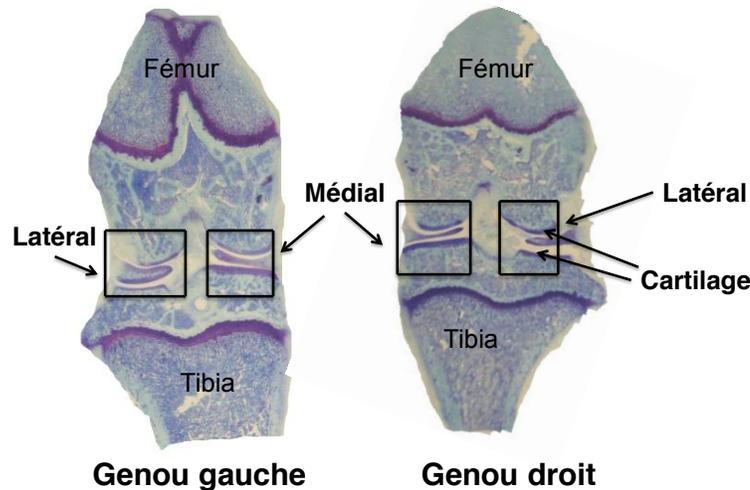
### **2.3 Méthodologie de l'analyse de dégénérescence du cartilage**

La récupération des articulations a tout d'abord été pratiquée sur des animaux morts qui avaient été utilisés pour une autre étude, en se basant sur la méthode décrite dans Gerwin et ses collaborateurs (Gerwin et al. 2010). Ces premiers essais nous ont permis de développer des techniques efficaces pour récupérer les articulations de genoux de rats tout en nous faisant prendre conscience des difficultés reliées à ces techniques. Nous avons aussi fait les premiers essais de décalcification, de coupes et de coloration sur ces articulations en nous basant sur les méthodes décrites par Schmitz et ses collaborateurs (Schmitz et al. 2010). Ces essais préliminaires nous ont permis de tester les techniques que nous voulions utiliser et ainsi de limiter le nombre d'animaux à utiliser pour la partie de mise au point des méthodologies.

Par la suite, les techniques développées à partir de ces premiers essais ont été améliorées en utilisant un petit groupe de rats (voir page 9 section 2.1). Après euthanasie des animaux, les articulations des genoux droit et gauche ont été minutieusement récupérées. Les articulations ont été fixées dans de la formaline 10%. Différents temps de fixation ont été testés. Les articulations ont ensuite été décalcifiées. Différentes procédures de décalcification ont été testées dont celle avec l'acide formique (Calex) et l'EDTA. La décalcification au Calex a été effectuée au laboratoire d'expertise en pathologie animale (LEPAQ), alors que nous avons monté un protocole pour faire la décalcification à l'EDTA en nous basant sur des protocoles utilisés dans la littérature (Schmitz et al. 2010). L'articulation a ensuite été coupée en deux en portions égales (coupe frontale) en suivant le ligament collatéral médial. La moitié antérieure de l'articulation (celle du côté de la rotule) a ensuite été mise dans une cassette pour le paraffinage qui a été effectué au LEPAQ.

Des coupes d'articulations ont été faites avec un microtome (4-8 coupes par articulation). Différentes épaisseurs de coupes ont été testées qui variaient entre 4 et 8 µm. Par la suite, les coupes ont été colorées à l'aide du bleu de Toluidine ou de la safranine-vert lumière en nous basant sur des protocoles utilisés dans la littérature (Schmitz et al. 2010). Les coupes ont ensuite été numérisées à l'aide du programme DP2-BSW (Olympus corporation). Une évaluation semi-quantitative des dommages causés à l'articulation a tout d'abord été faite. Par la suite, des mesures de largeur, d'épaisseur et d'aire de cartilage ont été réalisées avec le programme DP2-BSW, afin de

déterminer si un de ces paramètres est assez constant sur les coupes. Les mesures ont été faites pour le cartilage du fémur et du tibia dans les régions latérales et médiales (voir Figure 1).



**Figure 1 : Coupes d'articulations de genoux de rats sains colorées au bleu de Toluidine.**

### 2.3.1 Résultats et discussion

Cette première étape du projet avait pour objectif de mettre au point les techniques de récupération, de décalcification, de coupe et de coloration des coupes des articulations de genoux de rats. Le tissu osseux est un tissu assez difficile avec lequel travailler et ce projet était notre première expérience de travail avec ce tissu. Pendant la première étape du projet, nous avons donc développé de l'expertise pour travailler avec ce tissu.

Nous avons tout d'abord mis au point des techniques efficaces pour récupérer le tissu osseux à partir de l'animal. L'utilisation d'une scie rotative (Dremel) nous a grandement facilité la tâche pour couper efficacement les os sans les briser. La formaline 10% est une solution couramment utilisée pour faire la fixation des tissus. C'est pourquoi nous avons utilisé cette solution pour faire la fixation des articulations. Par la suite, nous avons testé différents temps de fixation des articulations dans la formaline 10%. Nos résultats démontrent que la fixation doit durer au minimum 24 heures et au maximum 72 heures. Un temps de fixation trop long nous donne de moins belles colorations des coupes de tissu.

L'étape suivante est la décalcification du tissu. Le tissu osseux est très dur et des lames de microtome très résistantes et très dispendieuses sont nécessaires pour faire des coupes de ce tissu sans décalcification. Par contre, après décalcification du tissu, le tissu devient plus mou et on peut en faire des coupes plus facilement. Dans la littérature, deux types de décalcifiants sont principalement utilisés pour décalcifier le tissu osseux, l'EDTA et l'acide formique (Schmitz et al. 2010). Nous avons donc testé ces deux types

de décalcifiants sur nos articulations de genoux de rats. La décalcification à l'acide formique (Calex) est très rapide (4-5 jours), alors que la décalcification avec l'EDTA prend environ un mois. Comme la décalcification avec l'EDTA se fait graduellement, l'intégrité du tissu est mieux conservée. De plus, la décalcification à l'EDTA est optimale pour préserver le protéoglycane. Il est important que le temps de décalcification ne soit pas trop long, car sinon le tissu devient trop mou et il est ensuite impossible de faire des coupes avec ce tissu. Il est donc important de vérifier l'état de décalcification de façon régulière (au moins une fois par semaine), lorsque la décalcification se fait par l'EDTA. L'état de décalcification est vérifié par un test chimique avec l'oxalate d'ammonium (Rosen 1981). Nos résultats démontrent que la décalcification à l'EDTA permet de mieux conserver l'intégrité du tissu et d'obtenir de meilleures colorations sur les coupes.

Après la décalcification, nous avons mis au point la technique de coupes d'articulations sur un microtome. Différentes épaisseurs de coupes ont été testées, entre 4 et 8  $\mu\text{m}$ . Les coupes de 4  $\mu\text{m}$  étaient trop fragiles et difficiles à manipuler. Pour leur part, les coupes de 8  $\mu\text{m}$  donnaient des colorations trop intenses. Nos résultats ont démontré qu'une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$  donnait les résultats optimaux.

Des colorations ont ensuite été réalisées sur les coupes de tissus. Nous avons testé la coloration à la safranine-vert lumière et la coloration au bleu de Toluidine. C'est la coloration au bleu de Toluidine qui nous a donné les meilleurs résultats avec une coloration plus intense du cartilage. C'est pourquoi nous avons choisi ce type de coloration pour les étapes ultérieures du projet.

Après coloration des coupes de tissu au bleu de Toluidine, le niveau de dégénérescence du cartilage au niveau du tibia et du fémur a été évalué à l'aide de différents paramètres. Les régions médiales et latérales ont été considérées séparément (voir Figure 1). Chez nos animaux traités avec une dose de 2 mg de MIA, l'intensité de dégénérescence du cartilage était assez prononcée. Chez tous les animaux traités au MIA, l'étendue de dégénérescence du cartilage était très sévère (plus de 75% du cartilage affecté). Donc un pointage de 5, sur l'échelle semi-quantitative, a été obtenu pour chacun des animaux. Chez certains animaux, le cartilage était même complètement disparu. De plus, des dommages à l'os subchondral ont été observés chez ces animaux.

Nous avons ensuite effectué, chez chacun des animaux, des mesures de largeur, d'épaisseur et de surface de cartilage dans le but de trouver une méthode plus quantitative nous permettant d'évaluer l'état de dégénérescence du cartilage. Les grilles de notation semi-quantitative, généralement utilisées dans les articles scientifiques, permettent de voir difficilement des variations subtiles dans l'état de dégénérescence du cartilage. Dans le but de mieux visualiser les effets potentiels sur le cartilage par le 2010-RD02, nous avons donc décidé de développer une méthode plus quantitative d'évaluation de l'état de dégénérescence du cartilage.

Pour les animaux contrôle (sans MIA), les mesures de surface de cartilage étaient assez similaires d'un individu à l'autre, alors que des variations plus importantes ont été observées pour les mesures d'épaisseur et de largeur de cartilage. Pour les animaux traités au MIA, la surface de cartilage restée intacte a aussi été mesurée (nous avons choisi les zones du cartilage dont la coloration au bleu de Toluidine était plus intense). Ces zones correspondaient au cartilage resté fonctionnel. Ce paramètre était un peu plus variable chez les animaux traités au MIA que chez les animaux contrôle, mais ce paramètre était quand même assez consistant d'un animal à l'autre. C'est pourquoi nous

avons choisi les mesures de surface de cartilage fonctionnel comme paramètre nous permettant d'évaluer, de façon plus quantitative, les dommages faits au cartilage par le MIA, au cours des autres étapes du projet (voir section 3).

### **2.3.2 Conclusion**

Cette première partie du projet nous a permis de développer les techniques de laboratoire nécessaires pour faire la récupération des articulations de genoux de rats, d'en faire des coupes et de colorer ces coupes. L'analyse des coupes colorées au bleu de Toluidine nous a permis de déterminer les paramètres de mesure les plus significatifs qui nous permettraient d'évaluer, avec le plus de précision possible, dans la deuxième partie du projet (voir section 3), l'état de dégénérescence du cartilage chez les animaux qui souffrent d'arthrose et qui ont été traités ou non avec le composé 2010-RD02. C'est la mesure de la surface du cartilage fonctionnel (zones du cartilage pour lesquelles la coloration au bleu de Toluidine est très intense) qui nous a semblé être le paramètre le plus pertinent et le plus constant pour évaluer l'état de dégénérescence du cartilage par le MIA. Nous espérons que ce paramètre nous permettrait de voir plus efficacement les effets de protection sur le cartilage que le composé novateur pourrait causer, comparativement aux paramètres semi-quantitatifs généralement utilisés dans la littérature (Gerwin et al. 2010).

## **3 Développement d'un modèle animal d'arthrose permettant de mettre en évidence l'effet analgésique d'un médicament de référence.**

Le développement du modèle d'arthrose qui constituait le deuxième objectif de ce projet était réalisé en deux étapes. La raison pour laquelle nous procédions en deux étapes était pour nous permettre, d'une part, de nous faire la main sur les différentes méthodes avec un nombre raisonnable d'animaux et, d'autre part, pour nous laisser la latitude d'apporter des modifications à nos méthodes d'une étape à l'autre, nous permettant ainsi d'optimiser notre modèle en prévision de l'étape finale.

Dans un premier temps, une dose élevée (3 mg) de MIA a été injectée chez les rats faisant partie de groupes atteints d'arthrose. Quatre groupes de cinq rats étaient comparés : trois groupes de rats recevant le MIA dans le genou droit et de la saline dans le genou gauche. Un de ces groupes ne recevait aucun traitement (groupe contrôle pathologique); un groupe recevait un traitement analgésique de référence (Morphine); un groupe recevait le 2010-RD02. Le groupe sans MIA recevait plutôt de la saline dans les deux genoux (groupe contrôle sain).

Dans un deuxième temps, une dose relativement faible (0,5 mg) de MIA était testée. Outre la dose de MIA diminuée, le nombre d'animaux et les groupes étaient les mêmes qu'à l'étape précédente. Une comparaison des différents paramètres mesurés nous permettait ainsi d'établir le niveau d'affectation de l'articulation infligée par l'arthrose selon la dose de MIA. Le test d'incapacité ainsi que la mesure de l'œdème par micromètre au niveau du genou étaient effectués à intervalles réguliers. Il est important de mentionner que lorsque ces mesures sont prises fréquemment cela permet d'établir l'évolution de la pathologie puis d'évaluer le potentiel thérapeutique du composé 2010-RD02 tout au long du processus arthritique.

L'utilisation d'un traitement analgésique de référence avait pour but d'établir si la variation interindividuelle pour certains paramètres est comparable à faible et à forte dose de MIA. De plus, le 2010-RD02 était testé à cette étape du projet comme première

indication de son effet selon l'état de dégénérescence du cartilage induit par la dose de MIA. Cette comparaison, à faible et à forte dose de MIA, avait pour objectif de nous orienter sur la dose de MIA à utiliser pour l'étape finale selon l'effet observé avec le 2010-RD02. Le nombre d'animaux prévu à cette étape était relativement restreint (5/groupe) de façon à appliquer la règle des 4R du CCPA, incluant « Réduire le nombre d'animaux utilisés ». Ce nombre ne permettait pas d'atteindre le seuil de signification statistique lors de la comparaison des traitements avec le groupe contrôle pathologique. Néanmoins, il suffisait largement pour déterminer la dose de MIA à utiliser lors de l'étude finale et aussi pour observer une tendance de l'effet du traitement de référence et du 2010-RD02. La différence statistique n'était pas requise puisque l'évaluation de l'effet du composé 2010-RD02 était seulement au stade exploratoire à cette étape-ci du projet.

### **3.1 Forte dose de MIA**

#### **3.1.1 Méthodologie**

##### **3.1.1.1 Animaux**

Vingt rats mâles de souche Sprague Dawley (Charles River, St-Constant) de 200-225 g étaient utilisés. Dans un premier temps, la forte dose de MIA (3 mg) était testée: un groupe de cinq rats recevait de la saline dans les deux genoux; 15 rats recevaient une forte dose de MIA (3 mg) dans le genou droit et de la saline dans le genou gauche. Parmi ces 15 rats, cinq rats ne recevaient aucun traitement, cinq rats recevaient le 2010-RD02 (50 mg/kg) par voie orale (p.o.) et cinq rats recevaient un analgésique de référence (morphine 6 mg/kg) une heure avant chacun des tests d'incapacité. La morphine était administrée sous cutanée à un volume de 0,6 ml/kg de la solution de 10 mg/ml, à l'aide d'une aiguille 27G. Le composé 2010-RD02 était administré en prévention à l'arthrose pendant six jours avant l'injection de MIA, puis durant les 21 jours suivants. Ce composé était administré à une dose de 50 mg/kg via la nourriture consommée par les animaux de ce groupe. Le poids corporel moyen des animaux de ce groupe était pris en considération pour ajuster la dose du composé incorporé à la nourriture deux fois par semaine. Puisque le produit était administré via son incorporation à la nourriture comme un supplément alimentaire, de la nourriture sèche en poudre (2018M.15, Harlan) était utilisée pour être reconstituée avec de l'eau pour ensuite former des boulettes humides de nourriture avec ou sans 2010-RD02. Voici brièvement la procédure de préparation de la nourriture. La nourriture, sous forme de poudre, était pesée dans un bécher puis l'eau stérile (ratio de 1,2 g par ml) était ensuite ajoutée et mélangée à l'aide d'une spatule. Une fois le mélange bien homogène, des petites boulettes étaient préparées à la main puis entreposées au congélateur pour la consommation de 3-4 jours. Pour l'incorporation du 2010-RD02 à la nourriture, celui-ci était d'abord dissout dans de l'eau stérile à 4°C pendant environ 16 heures par mélangeur automatique (20-25 rpm par rotamix). Le contenant de la solution était protégé de la lumière en tout temps en étant enveloppé dans une feuille d'aluminium. Une fois le mélange homogène, la solution de 2010-RD était ajoutée à la nourriture en poudre, respectant le ratio de 1,2 g par ml.

Lors de la semaine d'acclimatation des animaux, trois séances durant lesquelles les animaux étaient mis dans l'habitacle de l'appareil de mesure d'incapacité ont été effectués sur une période de 5-10 minutes. Une fois les animaux acclimatés, les mesures d'incapacité ont été faites avant puis 1, 3, 7, 10, 13, 17, 20 jours après l'injection de MIA. Pour chaque essai, trois à cinq mesures étaient prises par animal pour calculer la moyenne d'incapacité de chaque individu.

La mesure de l'inflammation au niveau du genou droit et la mesure contrôle du côté gauche ont été prises à l'aide d'un micromètre (séries 227-203, Mitutoyo) réglé à un niveau de pression de 0,5 Newton. La mesure était prise sur la largeur du genou (médiolatéral), juste en dessous de la rotule. Les mesures d'inflammation ont été faites avant puis 1, 2, 3, 7, 10, 13, 17, 20 jours après l'injection de MIA. Pour chaque essai, trois mesures étaient prises par animal pour calculer la moyenne d'inflammation de chaque individu.

Deux suivis hebdomadaires de l'alimentation et du poids corporel étaient effectués tout au long de l'étude. L'euthanasie était effectuée 21 jours post-injection de MIA i.a. ce qui permettait de vérifier sur une période prolongée l'effet du traitement, à la fois sur l'état des cartilages à ce stade avancé de dégénérescence ainsi que sur l'incapacité de l'articulation infligée d'arthrose et l'inflammation.

### 3.1.1.2 Récupération des articulations

Après euthanasie, les articulations des genoux droit et gauche étaient minutieusement récupérées. Les articulations étaient fixées dans de la formaldéhyde 10% pendant un maximum de 72 heures. Les articulations étaient ensuite décalcifiées par une solution d'EDTA 14%. Le niveau de décalcification était vérifié régulièrement jusqu'à ce qu'il soit adéquat (test à l'oxalate d'ammonium). L'articulation était ensuite coupée en deux en portions égales (coupe frontale) en suivant le ligament collatéral médial. La moitié antérieure de l'articulation (côté rotule) était ensuite mise dans une cassette pour le paraffinage qui était effectué au LEPAQ.

Des coupes d'articulations de 5 µm étaient effectuées avec un microtome, puis colorées au bleu de Toluidine. Les coupes étaient numérisées à l'aide du programme DP2-BSW et puis l'analyse des coupes était effectuée avec le même programme. L'aire de cartilage a été mesurée au niveau du tibia et du fémur, en choisissant les parties où la coloration au bleu de Toluidine était la plus intense. Ces parties représentaient le cartilage fonctionnel. Les régions latérale et médiale (voir Figure 1) ont été traitées séparément. Pour chaque coupe d'articulation, quatre mesures d'aire de cartilage ont été effectuées : tibia latéral, tibia médial, fémur latéral et fémur médial. Pour chaque articulation de chaque animal, les mesures d'aire ont été effectuées sur quatre coupes. Une moyenne d'aire de cartilage pour chaque animal a ensuite été calculée au niveau de chacune des quatre régions. Par la suite, une moyenne d'aire pour chacun des groupes (n=5) a été faite, au niveau de chacune des régions.

### 3.1.1.3 Hébergement

Les rats étaient hébergés deux ou trois par cage. Chaque cage était équipée d'un système manuel de distribution d'eau et la nourriture était fournie *ad libitum*. Les cages étaient clairement identifiées à l'aide d'un carton par un code de couleur selon les groupes, indiquant également l'étude, le groupe, le numéro et le sexe des animaux.

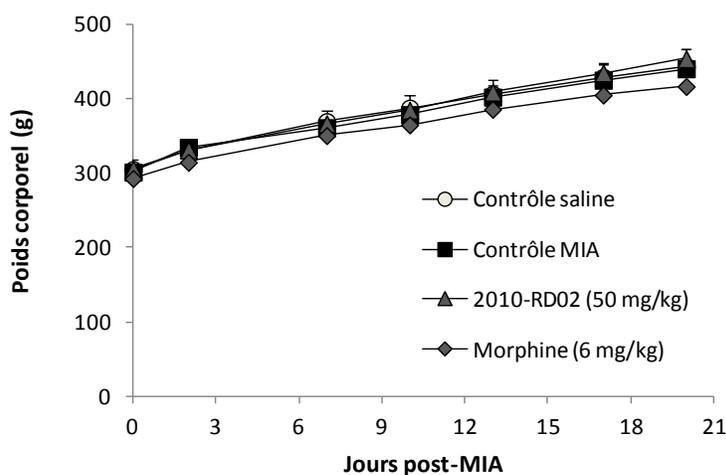
La salle d'hébergement était maintenue à une température ambiante de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  et à une humidité relative de  $40 \pm 10\%$ . La température et l'humidité de la salle d'hébergement étaient mesurées tous les jours et enregistrées. Un cycle lumière/noirceur de 12 heures était assuré par un système de contrôle automatique et 8-10 changements d'air/heure étaient assurés par le système de ventilation.

### 3.1.1.4 Statistique

L'analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification (temps et traitement), avec un intervalle de confiance de 95 %, a été utilisée pour comparer le poids corporel, l'inflammation et l'incapacité, entre le groupe contrôle sain (groupe saline), les groupes traités (analgésique et 2010-RD02) et le groupe contrôle arthritique (groupe MIA). L'analyse post-hoc qui a été utilisée dans cette étude est la comparaison multiple de Bonferroni et le groupe de référence comparé aux autres groupes était le groupe MIA. Le test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique), avec un intervalle de confiance de 95 %, a été utilisé pour comparer l'aire de cartilage entre le groupe contrôle sain (groupe saline), les groupes traités (analgésique et 2010-RD02) et le groupe contrôle arthritique (groupe MIA). Ce test non paramétrique a été utilisé puisqu'il manquait certaines valeurs d'aire de cartilage pour certains animaux dans certains groupes. Dans chaque graphique, la moyenne et l'erreur-type de chacun des groupes sont présentées.

### 3.1.2 Résultats et discussion

Le poids corporel de chaque animal a été mesuré deux fois par semaine tout au long de l'étude. La comparaison des groupes démontre que l'arthrose, liée à l'injection i.a. de MIA, n'a pas entraîné de changement au niveau de la prise de poids corporel (Figure 2). Aucun des deux traitements, tant la morphine que le 2010-RD02, n'a entraîné de façon significative un effet sur le poids corporel.

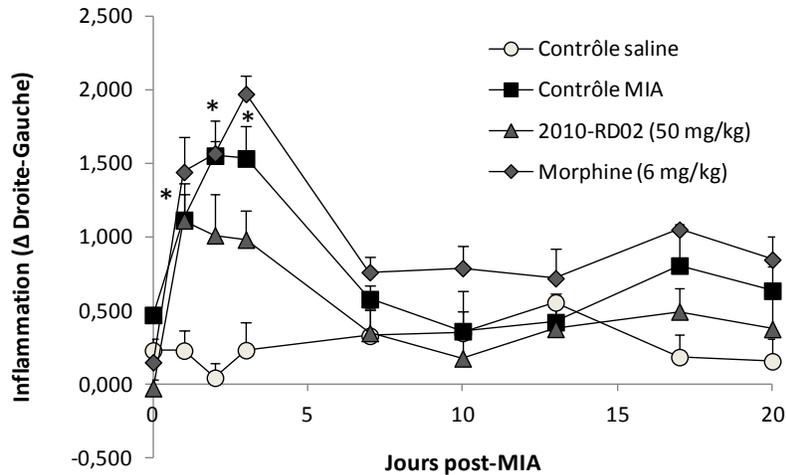


**Figure 2 : Suivi du poids corporel moyen de chaque groupe pendant l'étude préliminaire I.**

Aucune différence significative entre les groupes.

Afin d'établir la cinétique de l'inflammation liée à l'arthrose, la largeur du genou droit et celle du genou gauche était mesurée par micromètre pour chaque animal, à intervalle régulier. La Figure 3 présente l'inflammation, selon l'écart ( $\Delta$ ) entre le genou droit et le genou gauche, pour chacun des groupes ayant reçu du MIA dans le genou droit comparativement au groupe saline ayant reçu de la saline dans les deux genoux. L'inflammation du genou droit était évidente chez le groupe MIA et le groupe traité à la morphine. Bien que l'inflammation était réduite chez les animaux ayant reçu le 2010-RD02, aucune différence significative n'a pu être observée par rapport au groupe MIA,

vu le nombre de cinq rats par groupe. Ce petit nombre était prédéfini pour estimer seulement à cette étape préliminaire la dose à laquelle le MIA devait être administré pour obtenir un effet du 2010-RD02.

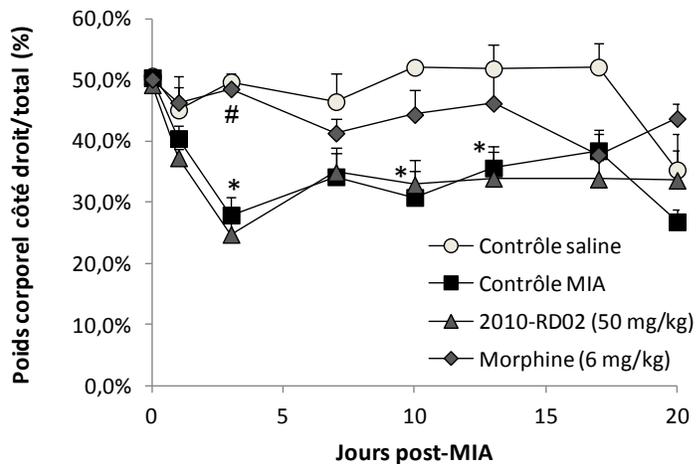


**Figure 3 : Suivi de l'inflammation (mm) par micromètre pendant l'étude préliminaire I.**

ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement). \*  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe saline et le groupe MIA selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

L'indice de douleur ressentie dans le genou droit était déterminé selon la mesure du poids corporel mis sur le côté droit par rapport au poids mis sur le côté gauche. Cette mesure était réalisée grâce à un appareil de mesure d'incapacité composé de deux balances côte-à-côte, sur lesquelles l'animal était installé et contenu dans un habitacle restreint limitant ses déplacements. Cette mesure reflète bien la douleur et l'incapacité d'un patient à mettre du poids sur l'articulation souffrant d'arthrose.

Par la mesure d'incapacité, nous avons constaté que la dose de 3 mg de MIA induisait une douleur dans le genou droit par rapport à l'injection de saline faite dans le genou gauche ( $P < 0,05$ , Figure 4). Selon les résultats obtenus, le traitement à la morphine (6 mg/kg) administré une heure avant la mesure d'incapacité, était efficace pour réduire la douleur ressentie dans le genou droit puisque le poids corporel était mieux partagé sur le côté droit et le côté gauche comparativement au groupe MIA. Comme il n'y avait qu'un nombre de cinq rats par groupe, le seuil de signification entre le groupe traité à la morphine et le groupe MIA était atteint uniquement au jour 3 post-MIA. Nous pouvons néanmoins conclure que le traitement de référence (contrôle positif) a été efficace pour réduire la douleur ressentie par l'animal au jour 3 post-MIA. Selon les résultats obtenus, le traitement 2010-RD02 n'a pas eu d'effet sur la mesure d'incapacité. Bien qu'une tendance à la baisse de l'inflammation pendant les premiers jours ait été observée avec le 2010-RD02, cela ne semble pas avoir eu d'impact sur la douleur ressentie.

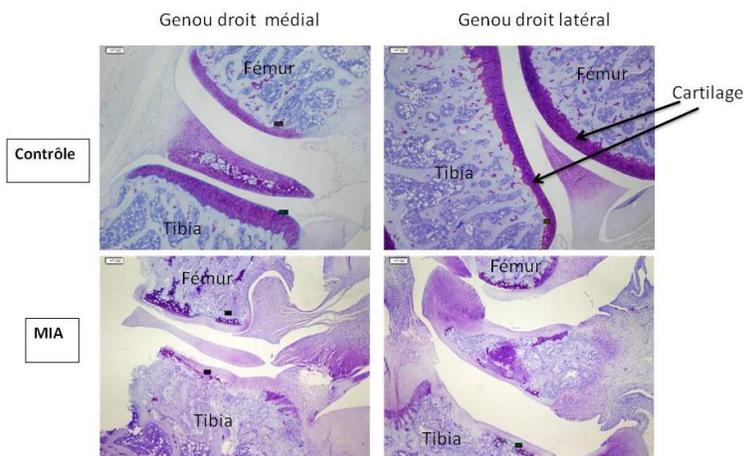


**Figure 4 : Suivi de la douleur ressentie par mesure d'incapacité pendant l'étude préliminaire I.**

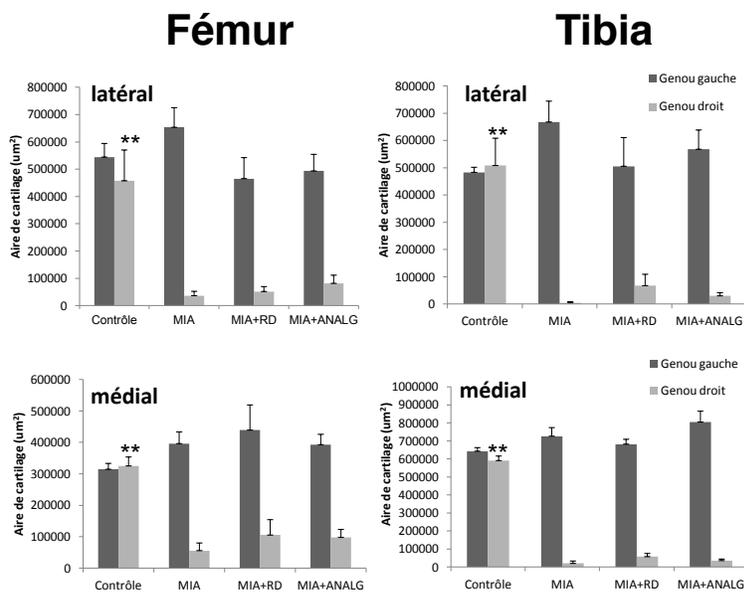
ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement).

\*  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe saline et le groupe MIA; #  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe traité à la morphine et le groupe MIA, selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

À la fin de l'étude, les animaux ont été euthanasiés pour faire une évaluation quantitative de l'aire du cartilage des genoux droit et gauche à partir de coupes histologiques colorées au bleu de toluidine. L'aire de cartilage était très similaire au niveau du genou gauche (injection de solution saline) de tous les groupes d'animaux, peu importe la région étudiée (Figure 6). Une dose de 3 mg de MIA dans le genou droit a atteint sévèrement le cartilage au niveau du fémur et du tibia peu importe la région étudiée (latérale ou médiale) (Figure 5 et Figure 6). Les traitements au 2010-RD02 et à la morphine n'ont pas permis de prévenir l'atteinte sévère du cartilage (Figure 6).



**Figure 5: Coupes d'articulations de genoux de rats colorées au bleu de Toluidine chez des animaux traités ou non au MIA.**



**Figure 6 : Analyse de l'aire de cartilage au niveau du fémur et du tibia dans l'étude préliminaire I.**

Description des groupes pour le genou droit : Contrôle : injection de saline; MIA : injection de 3 mg de MIA; MIA+RD : injection de 3 mg de MIA et traitement avec le 2010-RD02 à une dose de 50 mg/kg; MIA+ANALG. : injection de 3 mg de MIA et traitement avec une dose de morphine de 6 mg/kg. Tous les genoux gauches ont reçu de la saline, peu importe le groupe. Analyse statistique de Kruskal-Wallis à un critère de classification (traitement). \*\*P < 0,01 : différence significative entre le groupe contrôle et le groupe MIA.

### 3.1.3 Conclusion sur l'étude préliminaire effectuée avec la forte dose de MIA

Cette étude a permis d'établir la cinétique de l'inflammation et d'incapacité suite à l'administration d'une forte dose de MIA (3 mg) dans le genou droit. En effet, il a été constaté que l'inflammation est significative dans les trois premiers jours post-MIA et qu'elle se résorbe par la suite. Quant à la cinétique de l'incapacité, une diminution de la répartition du poids corporel du côté droit (MIA) par rapport au côté gauche (saline) a été observée durant les 14 premiers jours post-MIA. À la fin de l'étude de 21 jours, la coloration au bleu de toluidine de coupes histologiques des articulations de genoux a permis de constater que la dose de 3 mg de MIA entraîne des dommages sévères du cartilage, voire même une destruction complète du cartilage dans le genou de certains animaux.

Considérant le niveau de sévérité d'arthrose attendu à la dose de 3 mg de MIA, la morphine, qui est un analgésique puissant, a été utilisée comme traitement de référence. La morphine (6 mg/kg) a entraîné une diminution de la douleur, permettant ainsi un rétablissement de la distribution du poids corporel sur le côté droit arthritique par rapport au côté gauche, non atteint. Comme il s'agit d'un analgésique, la morphine n'a pas entraîné d'amélioration au niveau de l'inflammation ni de l'atteinte du cartilage du genou arthritique. Quant au 2010-RD02 (50 mg/kg), il a eu pour effet de réduire

l'inflammation dans les premiers jours post-MIA mais pas de façon significative. Le 2010-RD02 n'a pas entraîné d'amélioration de l'incapacité à mettre du poids sur le côté droit arthritique ni empêché les dommages au cartilage.

## **3.2 Faible dose de MIA**

### **3.2.1 Méthodologie**

#### **3.2.1.1 Animaux**

Vingt rats mâles de souche Sprague Dawley (Charles River, St-Constant) de 200-225 g étaient utilisés. Dans cette deuxième étude, la faible dose de MIA (0,5 mg) était testée: un groupe de cinq rats recevait de la saline dans les deux genoux; 15 rats recevaient une faible dose de MIA (0,5 mg) dans le genou droit et de la saline dans le genou gauche. Parmi ces 15 rats, cinq rats ne recevaient aucun traitement, cinq rats recevaient le 2010-RD02 (50 mg/kg) par gavage quotidien (p.o.) et cinq rats recevaient un analgésique de référence (Tramadol 100 mg/kg) une heure avant chacun des tests d'incapacité. Le composé 2010-RD02 était administré en prévention à l'arthrose pendant six jours avant l'injection de MIA, puis durant les 21 jours suivants. Le poids corporel moyen des animaux de ce groupe était mesuré deux fois par semaine et pris en considération pour ajuster la dose du composé administré par gavage.

La mesure des paramètres (test d'incapacité et inflammation) était effectuée à intervalle régulier pour tous les animaux. Deux suivis hebdomadaires du poids corporel étaient effectués tout au long de l'étude. L'euthanasie était effectuée 21 jours post-injection de MIA i.a. ce qui permettait de vérifier sur une période prolongée l'effet du traitement à la fois sur l'incapacité de l'articulation infligée d'arthrose, sur l'inflammation ainsi que sur l'état des cartilages.

#### **3.2.1.2 Récupération des articulations**

Après euthanasie, les articulations des genoux droit et gauche étaient minutieusement récupérées. Les articulations étaient ensuite préparées pour la coupe et la coloration tel que décrit à la section 3.1.1.2.

#### **3.2.1.3 Hébergement**

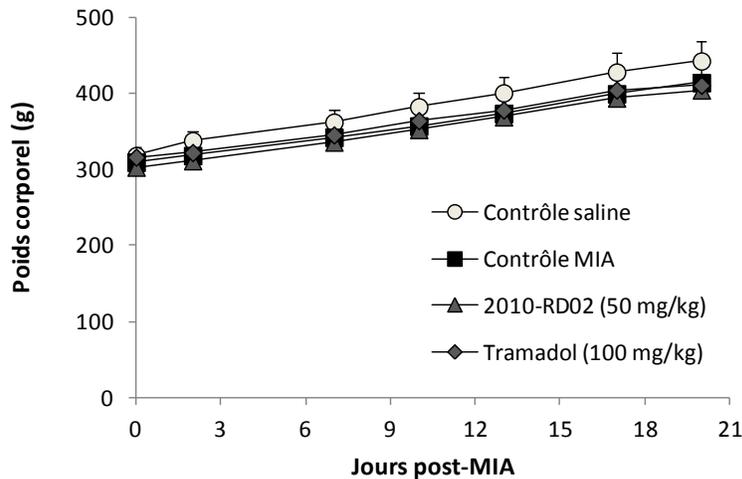
Les rats étaient hébergés dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 3.1.1.3.

#### **3.2.1.4 Statistique**

L'analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification (temps et traitement), avec un intervalle de confiance de 95 %, a été utilisée pour comparer le poids corporel, l'inflammation et l'incapacité, entre le groupe contrôle sain (groupe saline), les groupes traités (analgésique et 2010-RD02) et le groupe contrôle arthritique (groupe MIA). L'analyse de variance (ANOVA) à un critère de classification (traitement), avec un intervalle de confiance de 95 %, a été utilisée pour comparer l'aire de cartilage entre le groupe contrôle sain (groupe saline), les groupes traités (analgésique et 2010-RD02) et le groupe contrôle arthritique (groupe MIA). L'analyse post-hoc qui était utilisée dans cette étude est la comparaison multiple de Bonferroni et le groupe de référence comparé aux autres groupes était le groupe MIA. Dans chaque graphique, la moyenne et l'erreur-type de chacun des groupes sont présentées.

### 3.2.2 Résultats et discussion

Tout comme à l'étude préliminaire I, le poids corporel de chaque animal a été mesuré deux fois par semaine tout au long de l'étude préliminaire II. L'arthrose légère, liée à l'injection i.a. de 0,5 mg de MIA, n'a pas entraîné de changement au niveau de la prise de poids corporelle (Figure 7). Aucun des deux traitements, tant le Tramadol que le 2010-RD02, n'a entraîné d'effet sur le poids corporel.

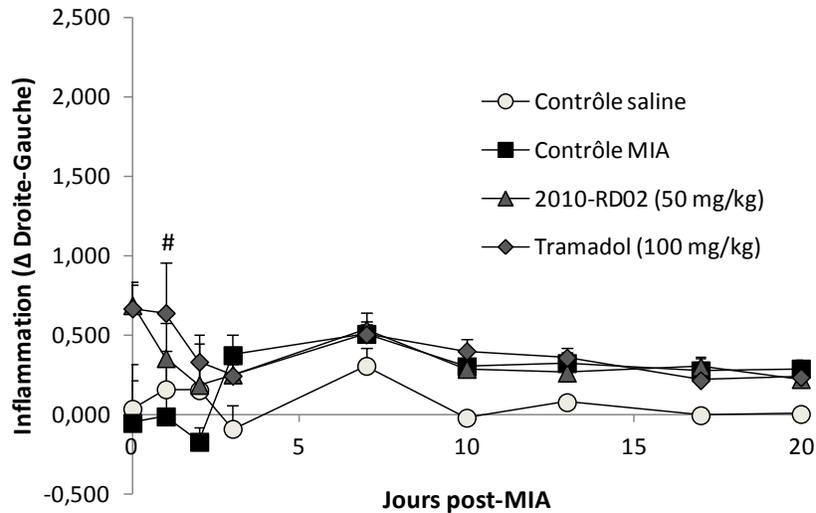


**Figure 7 : Suivi du poids corporel moyen de chaque groupe pendant l'étude préliminaire II.**

Aucune différence significative entre les groupes.

Contrairement aux résultats d'inflammation obtenus avec la dose de 3 mg de MIA, la dose de 0,5 mg de MIA n'a pas entraîné une inflammation significative du genou droit (Figure 8). En d'autres termes, l'injection de saline dans le genou gauche et celle d'une faible dose de MIA dans le genou droit ne semblent pas entraîner une inflammation significativement différente. Ceci peut être dû au fait qu'une si faible dose de MIA entraîne partiellement la mort de chondrocytes ce qui a pour effet d'entraîner un niveau négligeable d'inflammation et variable d'un animal à l'autre.

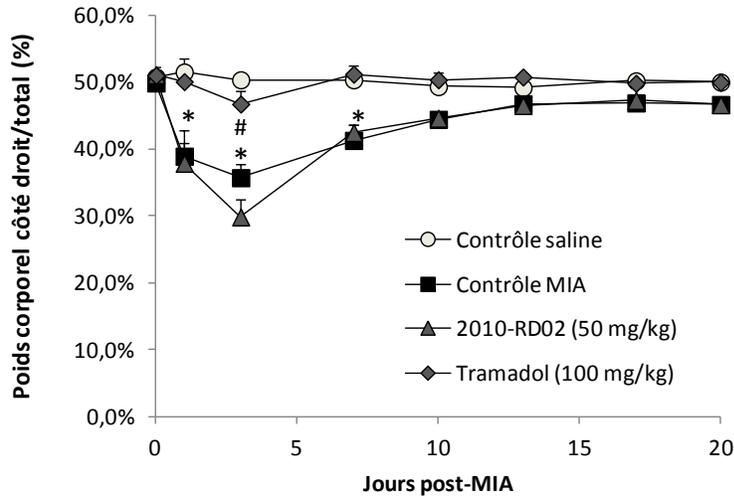
Selon les résultats observés, le Tramadol a causé de l'inflammation dans le genou droit comparativement au groupe contrôle MIA (Jour 1 post-MIA,  $P < 0,05$ ). L'effet pro-inflammatoire du MIA à cette dose semble si négligeable qu'il se peut que l'effet observé avec le Tramadol soit simplement lié à la variabilité interindividuelle.



**Figure 8 : Suivi de l'inflammation (mm) par micromètre pendant l'étude préliminaire II.**

ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement). #  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe traité au Tramadol et le groupe MIA, selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

Par la mesure d'incapacité, nous avons constaté que la dose de 0,5 mg de MIA induisait une douleur dans le genou droit par rapport à l'injection de saline faite dans le genou gauche au cours de la première semaine ( $P < 0,05$ , Figure 9). À cette dose plus faible de MIA, il apparaît évident que la douleur était moins intense et moins persistante si on compare ces données avec celles obtenues avec la dose de 3 mg de MIA. Le Tramadol étant un analgésique moins puissant que la morphine, il était utilisé dans cette étude précisément pour vérifier l'effet d'un tel analgésique contre une douleur modérée. Ainsi, le traitement au Tramadol (100 mg/kg), administré une heure avant la mesure d'incapacité, a été efficace pour réduire la douleur ressentie dans le genou droit comparativement au groupe MIA (Figure 9). Comme il a été observé avec la morphine, le seuil de signification entre le groupe traité au Tramadol et le groupe MIA a été atteint uniquement au jour 3 post-MIA. Le nombre d'animaux restreint explique ce résultat selon nous. Selon les résultats obtenus, le traitement 2010-RD02 n'a pas eu d'effet sur la mesure d'incapacité.



**Figure 9 : Suivi de la douleur ressentie par mesure d'incapacité pendant l'étude préliminaire II.**

ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement). \*  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe saline et le groupe MIA; #  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe traité au Tramadol et le groupe MIA, selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

La mesure de l'aire du cartilage pour le fémur et le tibia à la fin de l'étude (21 jours post-MIA) a permis de confirmer que l'atteinte de l'articulation était partielle. Contrairement à la dose de 3 mg de MIA qui avait causé une dégradation pratiquement complète du cartilage, tant au niveau du tibia que du fémur, la dose de 0,5 mg de MIA a causé des dommages beaucoup moins importants (Figure 10). Aucune différence significative de l'aire de cartilage au niveau du fémur latéral et du tibia latéral n'a été observée lorsque les genoux droits étaient comparés entre les différents groupes (Figure 10). Cependant, au niveau du tibia médial, le MIA a causé une diminution d'environ 70% de l'aire de cartilage. Curieusement, le MIA a causé une augmentation importante de l'épaisseur du cartilage au niveau du fémur médial du genou droit. L'aire de cartilage a subi une augmentation pratiquement du double. Le 2010-RD02 et le Tramadol n'ont pas permis de protéger le cartilage atteint par l'arthrose au niveau du tibia médial. L'aire de cartilage était très similaire au niveau des genoux gauches (injection de solution saline) de tous les groupes d'animaux pour toutes les régions, sauf au niveau du fémur latéral où la variabilité entre les groupes était plus grande.

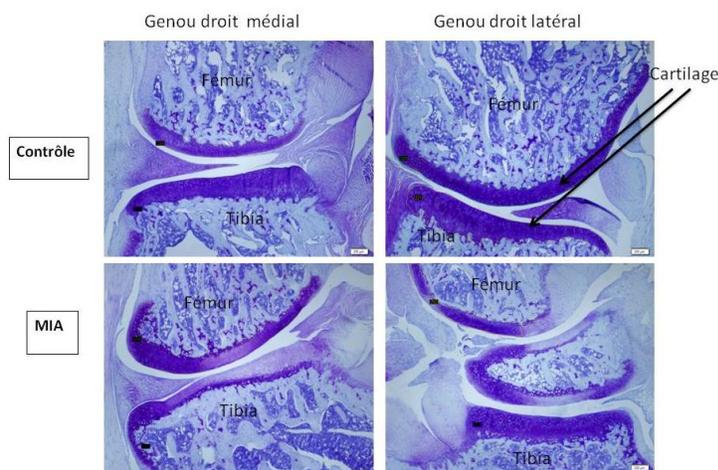


Figure 10: Coupes d'articulation de genoux de rats colorées au bleu de Toluidine chez des animaux traités ou non au MIA.

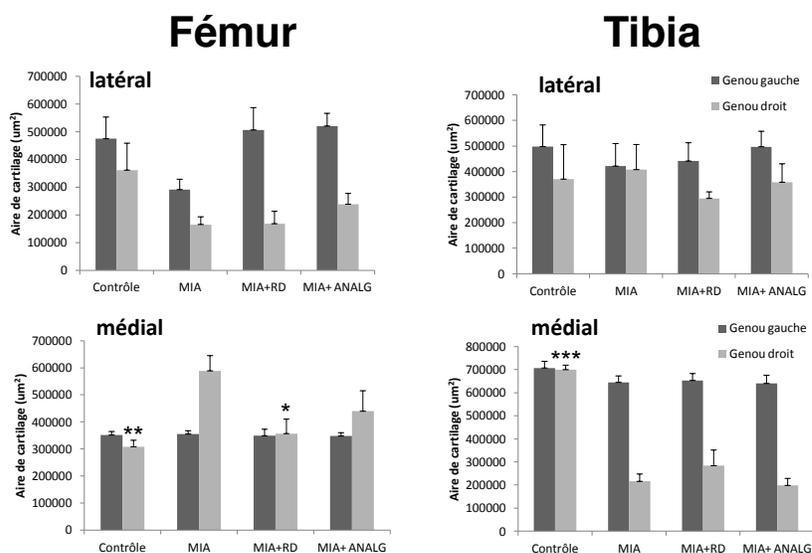


Figure 11 : Analyse de l'aire de cartilage au niveau du fémur et du tibia dans l'étude préliminaire II.

Description des groupes pour le genou droit : Contrôle : injection de saline; MIA : injection de 0,5 mg de MIA; MIA+RD : injection de 0,5 mg de MIA et traitement avec le 2010-RD02 à une dose de 50 mg/kg; MIA+ANALG. : injection de 0,5 mg de MIA et traitement avec une dose de tramadol de 100 mg/kg. Tous les genoux gauches ont reçu de la saline, peu importe le groupe. ANOVA à un critère de classification (traitement). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 : différence significative avec le groupe MIA.

### **3.2.3 Conclusion sur l'étude préliminaire effectuée avec la faible dose de MIA**

Cette étude a permis de constater qu'une si faible dose de MIA (0,5 mg) n'entraîne pas d'inflammation significative au niveau de l'articulation arthritique. La dose de 0,5 mg de MIA a entraîné néanmoins une incapacité chez le rat à mettre du poids corporel du côté droit (MIA) par rapport au côté gauche (saline) durant les 7 premiers jours post-MIA. De plus, la mesure de l'aire du cartilage pour le fémur et le tibia à la fin de l'étude (21 jours post-MIA) a permis de confirmer que l'atteinte de l'articulation était partielle.

Considérant l'atteinte arthritique atténuée qui était attendue à la dose de 0,5 mg de MIA, le Tramadol, qui est un analgésique modéré, a été utilisé comme traitement de référence. Cet analgésique (100 mg/kg) a entraîné une diminution de la douleur arthritique, selon la distribution du poids corporel sur le côté droit par rapport au côté gauche. Comme il s'agit d'un analgésique, le Tramadol n'a pas entraîné d'amélioration au niveau de l'inflammation ni de l'atteinte du cartilage du genou arthritique. Quant au 2010-RD02 (50 mg/kg), considérant l'inflammation négligeable infligée à la dose de 0,5 mg de MIA, il a été impossible de déterminer son effet anti-inflammatoire. Par ailleurs, aucun effet analgésique du 2010-RD02 n'a été observé, ni sur l'atteinte du cartilage.

### **3.3 Conclusion sur le développement du modèle animal d'arthrose**

La réalisation des deux études a permis de comparer l'effet entraîné par une forte dose et une faible dose de MIA sur chacun des paramètres mesurés. Les résultats obtenus nous permettent de conclure qu'une trop faible dose de MIA (0,5 mg) entraîne peu d'inflammation et une variation interindividuelle trop importante, qui risque d'entraîner des résultats statistiquement non-pertinents. La dose de 3 mg de MIA entraîne par contre une inflammation et une douleur significative ainsi qu'une atteinte sévère du cartilage. Deux analgésiques, la morphine plus puissante pour l'atteinte sévère du cartilage puis le Tramadol, plus modéré, pour l'atteinte partielle du cartilage, ont clairement entraîné un soulagement de la douleur ressentie chez les animaux traités avec un analgésique comparativement aux animaux du groupe contrôle pathologique. L'utilisation de ces deux analgésiques a permis de constater d'une part que la mesure d'incapacité est très efficace pour refléter la douleur ressentie du côté atteint d'arthrose et d'autre part, cela a permis également de vérifier la variation interindividuelle selon la dose de MIA et selon la réponse au traitement pharmacologique.

De plus, le 2010-RD02 était testé à cette étape du projet comme première indication de son effet selon l'état de dégénérescence du cartilage induit par la dose de MIA. Une tendance à la baisse de l'inflammation a été observée avec le 2010-RD02 dans le modèle sévère d'arthrose. La différence statistique n'était pas requise à cette étape-ci du projet puisque l'évaluation de l'effet du composé 2010-RD02 était seulement au stade exploratoire. Comme la comparaison, à faible et à forte dose de MIA, avait aussi pour objectif de nous orienter sur la dose de MIA à utiliser pour l'étape finale selon l'effet observé avec le 2010-RD02, cet objectif a été largement atteint.

## **4 Validation de la nouvelle plateforme d'arthrose à l'aide d'un composé naturel novateur.**

L'étape finale du projet consistait en la validation de notre modèle animal d'arthrose par une étude pharmacodynamique, permettant par la même occasion de vérifier l'efficacité du composé de notre partenaire dans des conditions optimisées. À cette étape du projet,

la dose de MIA devait être sélectionnée selon les résultats obtenus par les deux études préliminaires. Considérant que la dose de 3 mg de MIA avait entraîné une dégradation quasi complète du cartilage du côté affecté et que la dose de 0,5 mg était insuffisante pour entraîner un niveau d'inflammation significatif, nous nous sommes tournés vers une dose intermédiaire. La dose de 2 mg de MIA a ainsi été utilisée à l'étape de validation. En se basant sur les résultats obtenus dans les étapes précédentes ainsi que sur la littérature scientifique (Bar-Yehuda et al. 2009; Pomonis et al. 2005), cette dose apparaissait la plus pertinente. D'une part, selon certains groupes de recherche, 2 mg de MIA entraîne de l'inflammation jusqu'au jour 22 post-MIA (Bar-Yehuda et al. 2009). Considérant que l'effet bénéfique du 2010-RD02 repose principalement sur sa propriété anti-inflammatoire, une dose de 2 mg de MIA devait ainsi permettre de vérifier son efficacité sur ce paramètre en particulier. D'autre part, la dose de 2 mg de MIA devait permettre d'entraîner un effet important mais moins dévastateur au niveau du cartilage (Pomonis et al. 2005). Une dose plus faible que 2 mg de MIA était exclue pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire du 2010-RD02 car un effet partiel de MIA risquait d'entraîner un niveau d'inflammation négligeable et variable d'un individu à l'autre.

L'étude pharmacodynamique devait initialement être effectuée à l'aide de deux doses de 2010-RD02, soit 25 et 50 mg/kg. Or, considérant l'effet anti-inflammatoire non-significatif de la dose du composé à 50 mg/kg observé dans la première étude préliminaire, il a été proposé par notre partenaire d'utiliser une seule dose de 2010-RD02 plus élevée, soit 250 mg/kg. De cette façon, notre partenaire voulait s'assurer que la dose de 2010-RD02 serait suffisante pour entraîner un effet anti-inflammatoire. Le traitement de référence qui a été utilisé lors de l'étude pharmacodynamique est le naproxen, un anti-inflammatoire non stéroïdien qui agit en inhibant la cyclo-oxygénase, une enzyme importante dans le mécanisme de l'inflammation et de la douleur. Cet anti-inflammatoire a été utilisé car il est souvent utilisé pour traiter les douleurs faibles ou modérées, la fièvre, l'inflammation et les arthralgies de certaines pathologies telles l'ostéoarthrite et l'arthrite rhumatoïde. Contrairement aux études préliminaires dans lesquelles le nombre d'animaux était restreint, l'étude pharmacodynamique incluait 13 animaux par groupe afin d'atteindre le seuil de signification pour les paramètres de mesure fonctionnelle et inflammatoire. La mesure structurale de l'affectation du cartilage n'a pas été effectuée à cette dernière étape puisque le produit de notre partenaire présentait principalement un potentiel anti-inflammatoire sans avoir d'effet sur le remodelage du cartilage, selon les résultats obtenus plus tôt.

## **4.1 Modèle animal d'arthrose**

### **4.1.1 Méthodologie**

#### **4.1.1.1 Animaux**

Trente-neuf (39) rats mâles de souche Sprague Dawley (Charles River, St-Constant) de 200-225 g étaient utilisés. Les animaux ont été identifiés à la base de la queue deux jours après leur arrivée à l'aide d'un marqueur permanent non-toxique. Une évaluation corporelle complète a été effectuée sur chacun des animaux. Le rapport de santé des animaux que procure le fournisseur a été conservé sous registre et atteste de l'absence d'infection. Chaque animal a été distribué dans une cohorte selon son poids corporel, de façon à obtenir des groupes uniformes pour ce paramètre. Les trois groupes qui étaient comparés dans cette étude étaient atteints d'arthrose via une injection de 50 µL de MIA (2 mg) dans le genou droit. Le même volume de saline était injecté dans le genou gauche chez tous les animaux. La nature des groupes était la suivante: un groupe

contrôle pathologique ne recevant aucun traitement; un groupe traité au 2010-RD02 (250 mg/kg) puis un groupe traité au Naproxen (10 mg/kg) (Tableau 2).

Après leur arrivée, une période de 7 jours a été allouée aux animaux pour les laisser s'acclimater. Après cette période, les animaux du groupe traité au 2010-RD02 ont débuté leur traitement. Le composé 2010-RD02 était administré en prévention à l'arthrose pendant sept jours avant l'injection de MIA, puis durant les 21 jours suivants. Ce composé était administré à une dose de 250 mg/kg via la nourriture consommée par les animaux de ce groupe. Le poids corporel moyen des animaux de ce groupe était pris en considération pour ajuster la dose du composé incorporé à la nourriture deux fois par semaine. Considérant que le produit devait être administré via son incorporation à la nourriture, de la nourriture sèche en poudre (2018M.15, Harlan) était utilisée pour être reconstituée avec de l'eau pour ensuite former des boulettes humides de nourriture avec ou sans 2010-RD02. Voici brièvement la procédure de préparation de la nourriture. La nourriture, sous forme de poudre, était pesée dans un bécher puis l'eau stérile (ratio de 1,2 g par ml) était ensuite ajoutée et mélangée à l'aide d'une spatule. Une fois le mélange bien homogène, des boulettes étaient préparées à la main puis entreposées au congélateur pour la consommation de 3-4 jours. Pour l'incorporation du 2010-RD02 à la nourriture, celui-ci était d'abord dissout dans de l'eau stérile à 4°C pendant environ 16 heures par mélangeur automatique (20-25 rpm par rotamix). Le contenant de la solution était protégé de la lumière en tout temps en étant enveloppé dans une feuille d'aluminium. Une fois le mélange homogène, la solution de 2010-RD était ajoutée à la nourriture en poudre, respectant le ratio de 1,2 g par mL. Le Naproxen (10 mg/kg), préparé et solubilisé dans une solution de carboxyméthylcellulose (0,5 %), était administré par gavage oral dans un volume de 2 mL/kg, à l'aide d'une aiguille orogastrique 22G. Le naproxen était administré une fois par jour, toujours à la même période de la journée, correspondant à 2 heures avant les mesures d'incapacité aux jours désignés et 4 heures avant les mesures d'inflammation par micromètre.

**Tableau 2:** Nature des groupes de l'étude pharmacodynamique.

Cohorte	N	Genou droit	Genou gauche	Traitement	Période de traitement
1	13	MIA	saline	Aucun	Aucun
2	13	MIA	saline	Naproxen	Du jour 0 au jour 21
3	13	MIA	saline	2010-RD02	Du Jour -7 au jour 21

Lors de la semaine d'acclimatation des animaux, trois épisodes d'habituation des animaux dans l'habitable de l'appareil de mesure d'incapacité ont été effectués sur une période de 5-10 minutes. Une fois les animaux acclimatés, les mesures d'incapacité ont été effectuées avant puis 1, 3, 7, 14, 21 jours après l'injection de MIA. Pour chaque essai, trois à cinq mesures étaient prises par animal pour calculer la moyenne d'incapacité de chaque individu.

La mesure de l'inflammation au niveau du genou droit et la mesure contrôle du côté gauche ont été prises à l'aide d'un micromètre (séries 227-203, Mitutoyo) réglé à un niveau de pression de 0,5 Newton. La mesure était prise sur la largeur du genou (médio-

latéral), sous la rotule. Les mesures d'inflammation ont été faites avant puis 1, 2, 3, 7, 14, 21 jours après l'injection de MIA. Pour chaque essai, trois mesures étaient prises par animal pour calculer la moyenne d'inflammation de chaque individu. Deux suivis hebdomadaires de l'alimentation et du poids corporel étaient effectués tout au long de l'étude. Aucune analyse histologique n'était effectuée sur les articulations à cette étape du projet puisqu'il avait été démontré dans les étapes précédentes que le 2010-RD02 n'agissait pas au niveau de la dégénérescence du cartilage mais plutôt comme anti-inflammatoire.

#### **4.1.1.2 Hébergement**

Les rats étaient hébergés deux ou trois par cage. Chaque cage était équipée d'un système manuel de distribution d'eau et la nourriture était fournie *ad libitum*. Les cages étaient clairement identifiées à l'aide d'un carton par un code de couleur selon les groupes, indiquant également l'étude, le groupe, le numéro et le sexe des animaux.

La salle d'hébergement était maintenue à une température ambiante de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  et à une humidité relative de  $40 \pm 10\%$ . La température et l'humidité de la salle d'hébergement étaient mesurées tous les jours et enregistrées. Un cycle lumière/noirceur de 12 heures était assuré par un système de contrôle automatique et 8-10 changements d'air/heure étaient assurés par le système de ventilation.

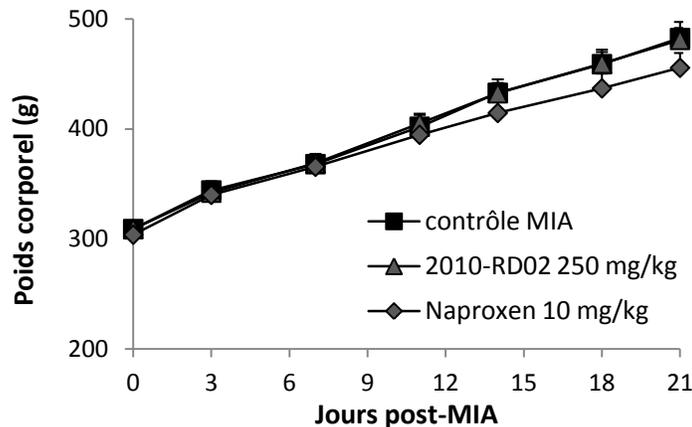
#### **4.1.1.3 Statistique**

L'analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification (temps et traitement), avec un intervalle de confiance de 95 %, a été utilisée pour comparer le poids corporel, la consommation de nourriture, l'inflammation et l'incapacité, entre le groupe contrôle pathologique (groupe MIA) et les groupes traités (Naproxen et 2010-RD02). L'analyse post-hoc qui était utilisée dans cette étude est la comparaison multiple de Bonferroni et le groupe de référence comparé aux autres groupes était le groupe MIA. Dans chaque graphique, la moyenne et l'erreur-type de chacun des groupes sont présentées.

#### **4.1.2 Résultats et discussion**

La pesée corporelle régulière permet généralement de s'assurer qu'un groupe ne souffre pas d'effet secondaire dû au traitement reçu. Dans l'étude actuelle, comme le 2010-RD02 était administré par son incorporation à la nourriture, il était d'autant plus important de faire un suivi de la quantité de nourriture prise par les animaux de ce groupe puisque la dose de 2010-RD02, ciblée à 250 mg/kg, était ajustée en fonction du poids corporel et de la consommation de nourriture. Une prévision du gain du poids corporel sur les 3 ou 4 jours de chaque période était considérée pour tenter d'atteindre la dose cible par kg de poids corporel. Tel que présenté dans la Figure 12, aucun des deux traitements, tant le naproxen que le 2010-RD02, n'a entraîné de façon significative un effet sur le poids corporel. Ceci suggère que le 2010-RD02, à la dose de 250 mg/kg, n'a pas entraîné d'effet délétère sur l'état de santé général de l'animal. Les animaux étaient d'ailleurs observés tous les jours, tel que recommandé par le CCPA, et aucun symptôme délétère n'a été observé.

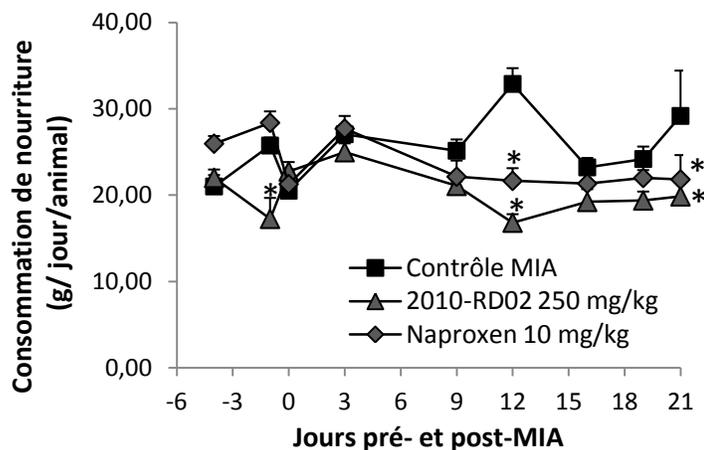
Considérant que l'extrait 2010-RD02 était incorporé à la nourriture à une dose assez élevée, un changement du goût de la nourriture aurait pu entraîner une diminution de la consommation de nourriture chez les animaux de ce groupe. Un ralentissement de la croissance normale aurait alors été observé.



**Figure 12 : Poids corporel moyen de chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique.**

Aucune différence significative entre les groupes.

Selon le suivi de la consommation de nourriture de chaque groupe, le 2010-RD02 semble avoir entraîné une diminution de la prise alimentaire pendant trois périodes différentes de l'étude pharmacodynamique comparativement au groupe contrôle MIA sans traitement (Figure 13). Le naproxen semble également avoir entraîné une réduction de la consommation de nourriture à deux périodes communes au groupe 2010-RD02 (Figure 13). Considérant que le poids corporel des animaux du groupe ayant reçu le 2010-RD02 était comparable à celui des animaux du groupe contrôle MIA, cela suggère que la mesure de nourriture consommée n'est pas d'une précision absolue, la mesure du poids corporel étant assurément précise. La mesure de la nourriture consommée était basée sur la quantité de nourriture déposée sur le grillage de chaque cage, à fréquence régulière, puis la quantité de nourriture restante à la fin de la période de 3 à 4 jours. Il se peut qu'une perte variable d'une cage à l'autre se produise selon le comportement des animaux hébergés. Nous avons déjà observé par le passé que certains rats développent l'habitude de récupérer de plus petits morceaux de nourriture et l'entreposent dans leur cage. Un tel comportement surestime la mesure de la consommation de nourriture. Le groupe contrôle MIA semble avoir eu deux périodes durant lesquelles la consommation de nourriture était accrue comparativement aux deux autres groupes.

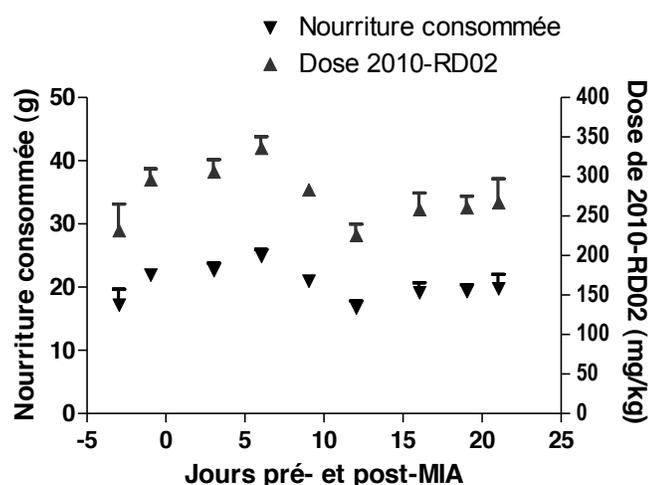


**Figure 13 : Estimation de la nourriture consommée en moyenne par animal/jour pour chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique.**

ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement). \* P < 0,05 : différence significative entre le groupe MIA et les groupes indiqués, selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

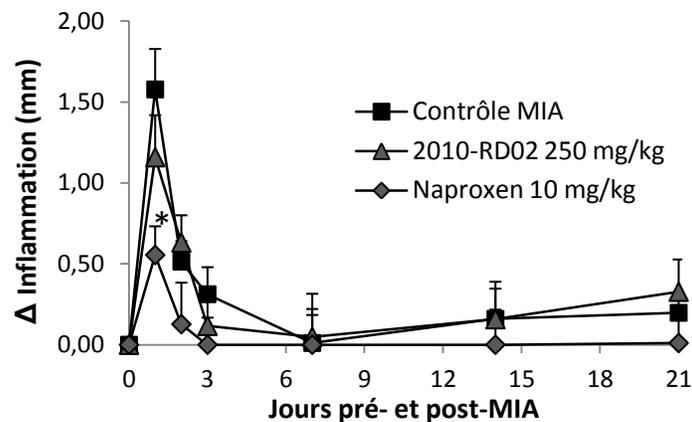
L'objectif du suivi de la consommation de nourriture était également d'ajuster la concentration de 2010-RD02 dans la nourriture, pour chaque période de 3 à 4 jours et de calculer par la suite la dose de 2010-RD02 administrée en moyenne aux animaux de ce groupe, tel que le présente la Figure 14. Tel que constaté, la consommation de nourriture était plus variable d'une période à l'autre et par le fait même, plus difficile à prévoir que la prise de poids corporel. Par conséquent, la dose de 2010-RD02 a fluctué principalement en fonction de la consommation de nourriture (Figure 14).

La dose quotidienne moyenne de 2010-RD02 reçue par les animaux de ce groupe au cours des 28 jours de traitement est estimée à 276 ± 11 mg/kg.



**Figure 14 : Estimation de la dose quotidienne de 2010-RD02 et de nourriture prise en moyenne par les animaux de ce groupe pendant l'étude pharmacodynamique.**

La Figure 15 présente l'inflammation, selon l'écart ( $\Delta$ ) entre le genou droit et le genou gauche, pour chacun des groupes ayant reçu du MIA, avec et sans traitement. La valeur initiale de l'écart entre le genou droit et le genou gauche de chaque animal a été soustraite individuellement pour calculer l'effet direct du MIA et ainsi diminuer la variation due à la différence de largeur du genou droit et du genou gauche avant les injections de MIA et de saline, au Jour 0. La Figure 15 démontre que l'injection de 2 mg de MIA a entraîné une inflammation principalement au cours des trois premiers jours suivant l'injection. Bien que l'inflammation était réduite chez les animaux ayant reçu le 2010-RD02, aucune différence significative n'a pu être observée par rapport au groupe contrôle MIA, malgré le nombre de 13 animaux par groupe (Figure 15). En comparaison, le traitement au naproxen, un anti-inflammatoire non stéroïdien, a réduit l'inflammation de façon significative (Figure 15).



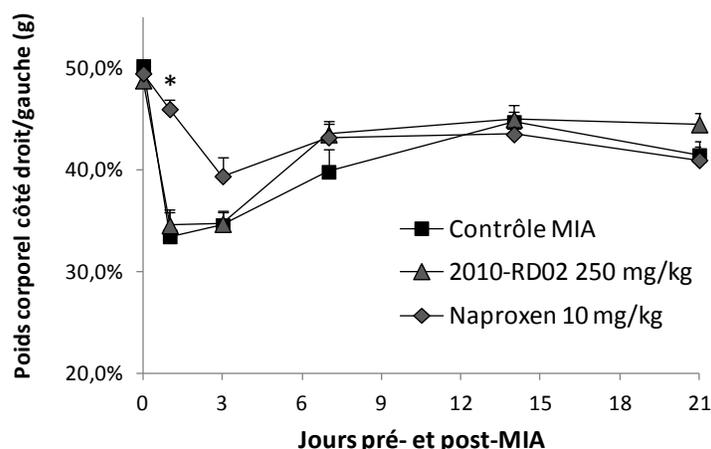
**Figure 15 : Inflammation (mm) de l'articulation arthritique en moyenne pour chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique.**

ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement). \*  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe MIA et le groupe traité au naproxen, selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

Une différence substantielle entre les deux traitements était leur mode d'administration respectif. Le naproxen a été administré par gavage orogastrique tous les jours, à la même période de la journée, tout au long du projet. En se basant sur certaines informations disponibles dans la littérature sur la cinétique de l'effet anti-inflammatoire et antalgique du naproxen (Bove et al. 2003), son administration a été cédulée en fonction de l'heure à laquelle les mesures d'inflammation et d'incapacité étaient effectuées. En comparaison, le 2010-RD02 était administré par son incorporation à la nourriture. Par conséquent, la dose quotidienne de ~250 mg/kg de 2010-RD02 a été administrée aux animaux possiblement plusieurs heures avant les mesures d'inflammation et d'incapacité considérant que les rats sont nocturnes et se nourrissent principalement pendant la nuit.

La mesure d'incapacité a été prise avant puis 1, 3, 7, 14 et 21 jours après l'injection de MIA (2 mg) et de saline. Selon les résultats illustrés à la Figure 16, le traitement 2010-

RD02 n'a pas eu d'effet sur la mesure d'incapacité. Considérant que l'effet anti-inflammatoire du 2010-RD02 était partiel, tel qu'observé à la Figure 15, une observation d'un effet antalgique était peu probable. Le traitement au naproxen (10 mg/kg) administré quatre heures avant la mesure d'incapacité, a été efficace pour réduire la douleur ressentie dans le genou droit 24 heures après l'injection de MIA. L'effet antalgique du naproxen n'était cependant pas significatif au jour 3 ni les jours suivants (Figure 16). Le naproxen est un anti-inflammatoire qui agit principalement comme inhibiteur de la cyclo-oxygénase (COX). Cette enzyme est impliquée dans le processus d'inflammation mais aussi dans la douleur. De ce fait, le naproxen est un antalgique mais pas un analgésique, ce qui explique l'effet partiel au niveau du soulagement de la douleur comparativement au tramadol ou à la morphine qui sont des analgésiques.



**Figure 16 : Distribution du poids corporel du côté droit par rapport au côté gauche (%) en moyenne pour chaque groupe suivi pendant l'étude pharmacodynamique.**

ANOVA à deux critères de classification (temps et traitement). \*  $P < 0,05$  : différence significative entre le groupe MIA et le groupe traité au naproxen, selon l'analyse post-hoc par comparaison multiple de Bonferroni.

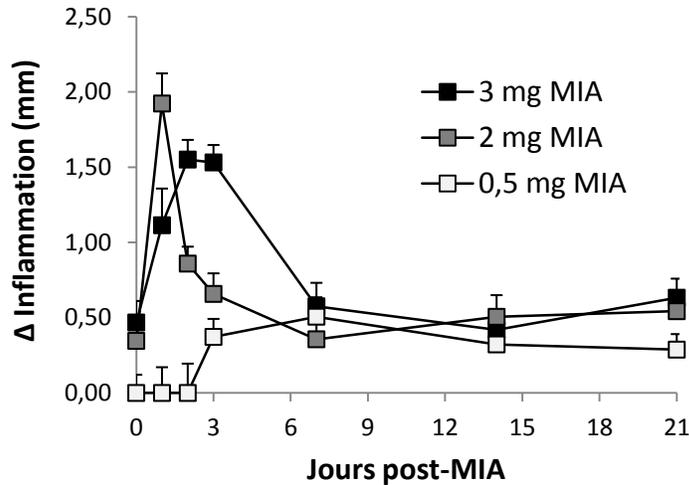
Comme nous ne connaissons pas le taux d'absorption des composés actifs contenus dans le 2010-RD02, ni sa biodisponibilité ou sa cinétique, il est difficile de déterminer la raison pour laquelle son effet anti-inflammatoire observé *in vitro* n'a pas été reproduit dans des conditions *in vivo*. D'autant plus que selon les informations recueillies dans des essais *in vitro* par notre partenaire, il semblerait que les ingrédients actifs du 2010-RD02 ciblent les médiateurs impliqués dans l'inflammation liée à l'arthrose. Néanmoins, indépendamment des cibles mécanistiques du composé thérapeutique testé, si l'ingrédient actif se rend partiellement à l'organe cible parce que son taux d'absorption est limité (absorption et biodisponibilité), ou encore, si son effet est optimal une heure après son administration orale et que les paramètres d'intérêt sont mesurés plutôt 12 heures après la prise du composé (cinétique), il devient alors difficile de mettre en évidence l'effet bénéfique de ces composés *in vivo*. Cette problématique peut être évitée si une étude cinétique des ingrédients actifs est réalisée avant l'étude d'efficacité. Les études cinétiques effectuées sur des produits complexes tels que ceux dérivés d'extraits d'animaux marins par exemple, ou de plantes, sont plus difficiles à analyser par les

méthodes traditionnelles en chimie puisqu'il n'existe pas nécessairement de standards de ces molécules, ni de leurs métabolites. Malgré la complexité de ces analyses, celles-ci sont souvent réalisables. Les entreprises vont néanmoins souvent opter pour réaliser d'abord une étude d'efficacité puisque celle-ci permet généralement de déterminer le potentiel de commercialisation du produit et son avenir en R&D. Le désavantage de cette approche par contre est la difficulté de conclure en un manque d'efficacité du composé lorsque l'effet attendu n'a pu être mis en évidence. Il est difficile en fait de savoir si l'effet n'a pas été observé dû aux conditions de traitement qui n'étaient pas optimales selon la cinétique du produit ou encore, dû au métabolisme *in vivo* qui rend le composé inactif.

#### **4.1.3 Analyse du modèle animal d'arthrose et des outils de mesure développés**

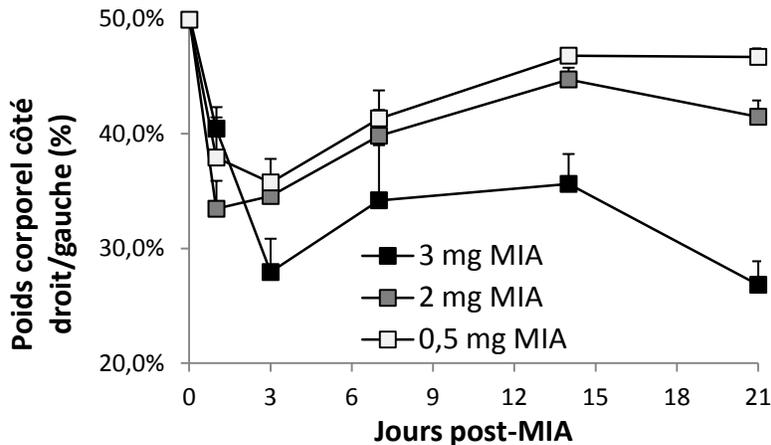
Lorsqu'on compare les résultats d'inflammation que nous avons obtenus au cours des différentes étapes de ce projet, testant différentes doses de MIA, on constate que 1- la cinétique de l'inflammation a été quelque peu variable entre la dose de 2 et 3 mg de MIA; 2- le niveau maximal d'inflammation atteint avec les doses de 2 et 3 mg de MIA est comparable; 3- la dose de 0,5 mg de MIA entraîne une inflammation négligeable (Figure 17). Si on compare nos résultats d'inflammation à ceux rapportés dans la littérature (Bove et al. 2003), la cinétique que nous avons obtenue par la mesure de la largeur du genou lors de l'étude pharmacodynamique (2 mg de MIA) est observée par le groupe de Bove et al. Celui-ci a mesuré l'inflammation des premiers jours par l'établissement d'un score histologique rapportant une expansion de la membrane synoviale due à l'accumulation de liquide et l'infiltration de cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles et lymphocytes). L'inflammation était plus importante le lendemain de l'injection de MIA puis s'atténuait graduellement. Une autre étude (Fernihough et al. 2004) présente plutôt une inflammation maximale aux jours 3 et 4, mais aucune mesure n'est présentée entre le jour 0 et le jour 3. Il se peut que notre technique d'injection intra-articulaire ou la méthode de mesure de la largeur du genou à l'aide du micromètre n'était pas encore tout à fait au point lors de notre première étude pilote I (3 mg de MIA). Évidemment, la méthode de mesure par micromètre comprend une certaine variation en soit puisque d'une fois à l'autre l'instrument de mesure peut être placé dans un angle quelque peu différent, ce qui accroît la variation. Il est préférable pour cette raison que le même manipulateur prenne les mesures tout au long de l'étude pour s'assurer que la mesure est prise de la même façon sur tous les animaux.

L'inflammation associée à une dose de 0,5 mg de MIA ne semble pas être rapportée dans la littérature et selon nos résultats, l'effet inflammatoire de cette dose est négligeable par rapport à une injection de saline, dans les premiers jours du moins (Figure 17). Selon l'étude de Bove et al, il existe peu de différence entre l'effet d'une dose de 1 mg et de 3 mg de MIA sur la distribution du poids corporel alors que l'effet observé à 0,3 mg de MIA était négligeable. Ces résultats appuient ceux que nous avons obtenus pour la mesure de l'inflammation en fonction de la dose. Toutefois, selon la mesure de la distribution du poids corporel que nous avons obtenue avec les doses de 0,5 mg et 2 mg de MIA, un effet d'amplitude similaire était observé alors que la dose de 3 mg de MIA a causé une incapacité plus sévère et soutenue comparativement à celle de 2 mg (Figure 18).



**Figure 17 : Suivi de l'inflammation (mm) de l'articulation arthritique selon la dose de MIA injectée dans le genou droit.**

Comme la cinétique et l'amplitude de l'incapacité entraînée par le MIA sont relativement variables d'une étude à l'autre selon les résultats rapportés (Bove et al. 2003; Pomonis et al. 2005), il se peut que la technique d'injection soit la source de cette variation. L'utilisation de différents numéros de lots de MIA peut aussi expliquer ces variations.

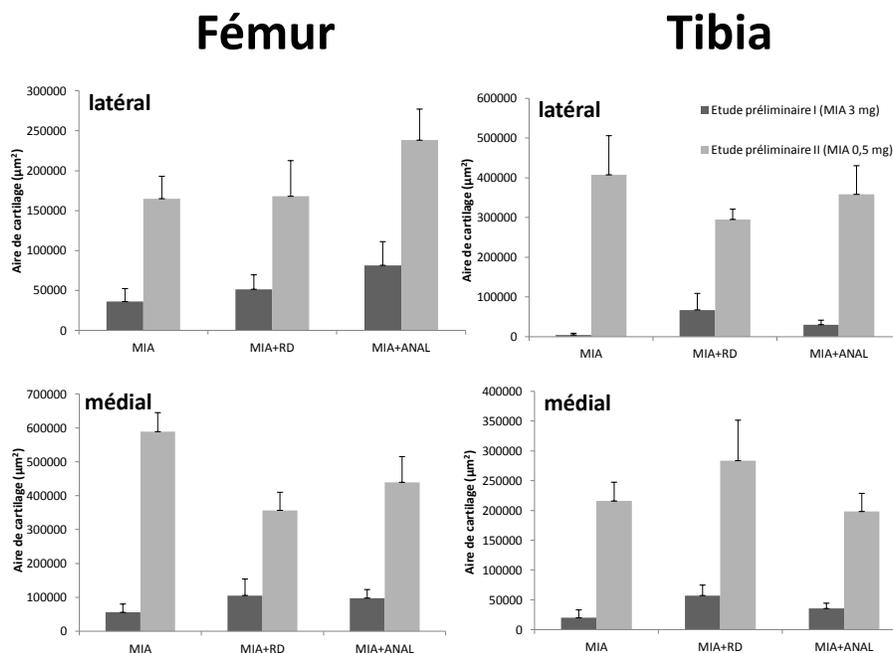


**Figure 18 : Suivi de la distribution du poids corporel du côté droit par rapport au côté gauche (%) selon la dose de MIA injectée dans le genou droit.**

L'analyse histologique du cartilage des genoux de rats traités au MIA nous a permis de quantifier les dommages causés par ce produit sur l'articulation et d'évaluer si le produit novateur (2010-RD02) avait un effet protecteur contre les dommages au cartilage causés par le MIA. Nous avons choisi de mesurer les aires de cartilage fonctionnel (zones du cartilage intensément colorées au bleu de Toluidine) comme indicateur des dommages causés à l'articulation. Différentes zones du cartilage ont été étudiées : fémur latéral, fémur médial, tibia médial et tibia latéral (Figure 1). Nous avons choisi d'étudier les zones de cartilage séparément, car il a été démontré que l'effet du MIA peut être plus important sur certaines zones du cartilage (Bove et al. 2003). Notre étude

démontre qu'il existe une corrélation entre l'aire de cartilage fonctionnel et le niveau de détérioration de l'articulation par le MIA : plus l'articulation est endommagée, plus l'aire de cartilage fonctionnel est faible. Dans la plupart des études de la littérature, des mesures semi-quantitatives sont utilisées pour évaluer les dommages à l'articulation causés par le MIA (Fernihough et al. 2004; Gerwin et al. 2010; Janusz et al. 2001). En mesurant des aires de cartilage fonctionnel, nous voulions développer un paramètre plus quantitatif pour nous permettre de déceler des variations plus subtiles des dommages à l'articulation afin de pouvoir déceler si le composé novateur (2010-RD02) avait un effet protecteur sur le cartilage.

Notre étude démontre que plus la dose de MIA est élevée, plus les dommages à l'articulation sont importants. Ces résultats sont conformes à ce qui a été rapporté dans la littérature (Janusz et al. 2001). Nous avons comparé les aires de cartilage fonctionnel dans les genoux droits (injection de MIA) des animaux pour chacune des deux études (Figure 19). La forte dose de MIA (3 mg) cause des dommages très importants au cartilage du genou (aires de cartilage fonctionnel très faibles), peu importe la région du cartilage étudiée (fémur latéral, fémur médial, tibia médial et tibia latéral), 21 jours après l'injection de MIA. Chez certains animaux, le cartilage avait même complètement disparu. Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus par Pomonis et ses collaborateurs chez le rat (Pomonis et al. 2005), avec une dose de MIA de 3 mg (l'analyse histologique a été faite dans cette étude 22 jours après l'injection de MIA). Par contre, avec la faible dose de MIA (0,5 mg), les dommages à l'articulation sont modérés (aires de cartilage fonctionnel plus grandes). Selon nos résultats, la zone de cartilage la plus affectée par la faible dose de MIA est la partie médiale du tibia, lorsqu'on compare les aires de cartilage avec les genoux contrôles (injection de salin). Dans l'étude de Bove et ses collaborateurs chez le rat (Bove et al. 2003), l'effet du MIA sur les articulations a été étudié 1,3,7 et 14 jours après l'injection de 1 mg de MIA dans le genou. Selon cette étude, c'est la partie médiale du cartilage du tibia qui est affectée la première par le MIA. Dans l'étude de Barve et ses collaborateurs (Barve et al. 2007), une dose de 0.2 mg de MIA causait des dommages au cartilage du tibia seulement, chez le rat, le cartilage du fémur étant resté intact. Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus dans ces deux études. Dans les genoux gauches (injection de saline), les aires de cartilage obtenues pour chacune des régions étaient similaires entre les études préliminaires I et II.



**Figure 19: Comparaison des aires de cartilage pour le fémur et le tibia du genou droit entre les études préliminaires I et II.**

Description des groupes: MIA : injection de 3 mg ou 0,5 mg de MIA; MIA+RD : injection de MIA et traitement avec le 2010-RD02; MIA+ANALG. : injection de MIA et traitement avec une dose d'analgésique (morphine ou tramadol).

Selon nos résultats, le composé novateur (2010-RD02) n'a malheureusement pas eu d'effet protecteur sur le cartilage, peu importe la dose de MIA utilisée et le mode d'administration du médicament (dans la nourriture ou par gavage). L'utilisation d'un analgésique (morphine ou tramadol) n'a pas eu d'effet sur les dommages aux articulations causés par le MIA.

Malgré les quelques variations observées, le portrait global du modèle d'arthrose induit par MIA est reproductible d'un laboratoire à l'autre et notre modèle suit ce profil général. Par ailleurs, tel que planifié, la plateforme que nous avons développée permet de mesurer trois paramètres importants liés à cette pathologie humaine : l'inflammation, la douleur ressentie du côté arthritique, mesurée par le test d'incapacité puis la dégénérescence du cartilage, par histologie. Cela en fait un modèle animal d'arthrose complet pour tester le potentiel thérapeutique d'une vaste gamme de composés bioactifs ayant des modes d'action variés.

#### 4.1.4 Conclusion sur le modèle animal d'arthrose et l'effet d'un médicament de référence.

L'étape finale de ce projet a permis d'établir la cinétique de l'inflammation et de l'incapacité suite à l'administration d'une dose intermédiaire de MIA (2 mg) dans le genou droit. La comparaison de l'effet des trois doses de MIA utilisées sur les mesures d'inflammation et d'incapacité confirme que la dose de 2 mg de MIA représente la dose

idéale pour un modèle d'arthrose servant à évaluer le potentiel thérapeutique de composés bioactifs. De plus, la validation du modèle d'arthrose s'est faite grâce à l'utilisation du naproxen, un anti-inflammatoire et antalgique, ayant permis d'observer une réduction significative de l'inflammation et de la douleur ressentie du côté arthritique au moment où ces deux paramètres étaient culminants. Ces résultats suggèrent que les conditions de mesure de l'incapacité et d'inflammation étaient optimales dans notre modèle d'arthrose considérant que le naproxen est un anti-inflammatoire et un antalgique plutôt qu'un analgésique.

À cette étape du projet, l'objectif était également de vérifier l'efficacité du composé de notre partenaire dans des conditions optimisées. Bien que le modèle animal semble adéquat pour tester des composés tels que des analgésiques, anti-inflammatoires et/ou antalgiques, le composé de notre partenaire n'a pas démontré une efficacité anti-inflammatoire significative. La dose de 250 mg/kg du 2010-RD02 n'est probablement pas en cause.

Finalement, deux stagiaires du programme de Techniques en Santé animale (145.AO) du Cégep de La Pocatière ont effectué leur stage de recherche requis dans le cadre du cours 145-DQW-10. Grâce à ce projet, les deux étudiantes ont développé certaines habiletés techniques en nécropsie, en prélèvement de tissus et d'échantillons biologiques. Elles ont aussi mis en pratique la coupe d'organes mis en blocs de paraffine par microtomie, le montage et la coloration de lames. Ce stage leur a permis aussi de pratiquer certaines manipulations avec les rongeurs telles que le gavage orogastrique et l'injection par voie intrapéritonéale.

## 5 Références

- Baime, M. J.: Glucosamine and chondroitin sulphate did not improve pain in osteoarthritis of the knee. *Evid Based Med* 2006, **11**, 115.
- Barve, R. A., J. C. Minnerly, D. J. Weiss, D. M. Meyer, D. J. Aguiar, P. M. Sullivan, S. L. Weinrich & R. D. Head: Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats:relevance to human disease. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007, **15**, 1190-1198.
- Bar-Yehuda, S., L. Rath-Wolfson, L. Del Valle, A. Ochaion, S. Cohen, R. Patoka, G. Zozulya, F. Barer, E. Atar, S. Pina-Oviedo, G. Perez-Liz, D. Castel & P. Fishman: Induction of an antiinflammatory effect and prevention of cartilage damage in rat knee osteoarthritis by CF101 treatment. *Arthritis Rheum* 2009, **60**, 3061-71.
- Black, C., C. Clar, R. Henderson, C. MacEachern, P. McNamee, Z. Quayyum, P. Royle & S. Thomas: The clinical effectiveness of glucosamine and chondroitin supplements in slowing or arresting progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2009, **13**, 1-148.
- Bove, S. E., S. L. Calcaterra, R. M. Brooker, C. M. Huber, R. E. Guzman, P. L. Juneau, D. J. Schrier & K. S. Kilgore: Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**, 821-30.
- Camplejohn, K. L. & S. A. Allard: Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry* 1988, **89**, 185-8.

- Clegg, D. O., D. J. Reda, C. L. Harris, M. A. Klein, J. R. O'Dell, M. M. Hooper, J. D. Bradley, C. O. Bingham, 3rd, M. H. Weisman, C. G. Jackson, N. E. Lane, J. J. Cush, L. W. Moreland, H. R. Schumacher, Jr., C. V. Oddis, F. Wolfe, J. A. Molitor, D. E. Yocum, T. J. Schnitzer, D. E. Furst, A. D. Sawitzke, H. Shi, K. D. Brandt, R. W. Moskowitz & H. J. Williams: Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006, **354**, 795-808.
- Fernihough, J., C. Gentry, M. Malcangio, A. Fox, J. Rediske, T. Pellas, B. Kidd, S. Bevan & J. Winter: Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004, **112**, 83-93.
- Gerwin, N., A. M. Bendele, S. Glasson & C. S. Carlson: The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18 Suppl 3**, S24-34.
- Janusz, M. J., E. Hookfin, S. A. Heitmeyer, J. F. Woessner, A. J. Freemont, J. A. Hoyland, K. K. Brown, L. C. Hsieh, N. G. Almstead, B. De, M. G. Natchus, S. Pikul & Y. O. Taiwo: Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001, **9**, 751-760.
- Kalbhenn, D. A.: Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 1987, **14 Spec No**, 130-1.
- Pomonis, J. D., J. M. Boulet, S. L. Gottshall, S. Phillips, R. Sellers, T. Bunton & K. Walker: Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 2005, **114**, 339-46.
- Rosen, A.: End-point determination in EDTA decalcification using ammonium oxalate. *Stain Technol* 1981, **56**, 48-49.
- Schmitz, L. N, K. S., V.B & T. Aigner: Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**, S113-S116.
- Strassle, B. W., L. Mark, L. Leventhal, M. J. Piesla, X. Jian Li, J. D. Kennedy, S. S. Glasson & G. T. Whiteside: Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthritis Cartilage*, **18**, 1319-28.

## SIGNATURES

---

Esther Millette, Ph. D., Scs. pharmaceutiques  
Chef de secteur en pharmacologie et chercheure

---

Céline Gagnon, Ph. D. Science pharmacie  
Enseignante au Cégep Lévis-Lauzon

---

Violette Mestre-Boivin, DEC, Santé animale  
Technicienne en santé animale

---

Vincent Tellier, DEC, Santé animale  
Technicien en santé animale

---

Mireille Pilote, M.Sc., Biologie moléculaire  
Chercheure en biologie