

Université de Montréal

**Métriologie de la douleur animale :
Validation sur des modèles de douleur viscérale bovine
et articulaires canins**

par

Pascale Rialland

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophae Doctor (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

option pharmacologie

Décembre, 2013

© Pascale Rialland, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Métriologie de la douleur animale :
Validation sur des modèles de douleur viscérale bovine
et articulaires canins

présentée par :
Pascale Rialland

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Manon Choinière, président-rapporteur
Éric Troncy, directeur de recherche
Jérôme del Castillo, co-directeur
Sylvie Lemay, membre du jury
Céline Gélinas, examinateur externe
Pascal Vachon, représentant du doyen de la FES

Résumé

La douleur est une expérience multidimensionnelle comportant des aspects sensoriels, émotionnels et cognitifs. Théoriquement, des méthodes de mesures comportementales, physiologiques, neurophysiologiques et sensorielles peuvent quantifier la douleur. Peu d'études ont étudié la validation des mesures utilisées en médecine vétérinaire. La recherche combine les travaux de Maîtrise et de Doctorat, traite en partie de la validité de méthodes. Dans cet objectif, nos travaux de recherche étudiaient la validité de méthodes comportementales, physiologiques et neurophysiologiques usuelles pour la mesure de la douleur en comparant les expressions de douleur (vache et chien) chez des animaux contrôle par comparaison à des animaux sous analgésie préventive ou sous traitement curatif suivant une douleur induite par chirurgie (modèles de douleur viscérale bovine ou orthopédique canine) ou causée par une maladie naturelle (arthrose canine). Une première étude comparait les mesures de la douleur entre les vaches du groupe placebo et celles sous analgésie postopératoire sur une durée de 21 jours suivant l'induction d'une douleur viscérale chronique. Les vaches du groupe placebo ont présenté une plus forte sensibilité à la douleur et une diminution de la noradrénaline et de la transthyréline mesurées dans le liquide cérébro-spinal, une diminution de l'activité motrice (AM) (moins que dans les groupes avec analgésie), de l'agitation enregistrée par vidéo-analyse et une augmentation du stress selon la mesure de l'activité électrodermique (AED). Les méthodes d'intérêt identifiées étaient les marqueurs spinaux, la mesure de la sensibilisation, de comportements par vidéo-analyse et de l'AM par bio-télémetrie. En utilisant des méthodes semblables à celles précédemment décrites, deux études expérimentales de douleur orthopédique ont été réalisées afin de comparer les réponses à la douleur entre des chiens traités avec une analgésie préventive (opioïdes et anti-inflammatoires, étude #2) ou un biphosphonate (tiludronate, étude #3) par comparaison à des chiens contrôles. Seules les échelles de douleur étaient différentes entre les études de recherche. Pour l'étude #2, les

chiens sous analgésie ont présenté de plus faibles scores de douleur mesurés avec l'échelle de douleur nommée 4A-VET et ceci simultanément à une faible réponse de l'AED une heure après la chirurgie de trochléoplastie. La fréquence du comportement spontané de 'la marche avec plein appui de la patte opérée' mesurée à l'aide de la vidéo-analyse augmentait chez les chiens sous analgésie préventive 24 heures après la chirurgie. L'étude #3 démontrait surtout l'apparition de sensibilisation centrale (à la fois par l'évaluation sensorielle quantitative et les marqueurs spinaux) chez les chiens contrôle, 56 jours après l'induction d'arthrose chirurgicale. Ainsi, les chiens traités avec le tiludronate ont présenté une différence sur la substance P et la transthyréine cérébro-spinale, une diminution de la sensibilisation périphérique, plus d'appui de la patte opérée lors de la marche selon la mesure du pic de force verticale (PFV), une augmentation de la fréquence de 'la marche avec plein appui de la patte opérée'. La sensibilisation centrale était associée à la diminution de PFV, et une augmentation de l'AED et du comportement spontané de 'la marche avec plein appui de la patte opérée'. Pour l'étude #4, la validité et la sensibilité des méthodes ont été évaluées dans une condition d'arthrose naturelle chez des chiens traités avec une diète enrichie en moule verte, un produit ayant des effets anti-inflammatoires et chondroprotecteurs attendus. Les chiens traités présentaient une diminution des scores de douleur *via* l'échelle nommée CSOM, une augmentation de PFV et une augmentation de l'AM. Dans l'ensemble, les résultats confirment que la vidéo-analyse évaluait la douleur de façon objective et pour des modèles différents de douleur et les marqueurs spinaux sont prometteurs. Le PFV était spécifique de la douleur orthopédique. La sensibilisation était présente lors de douleur pathologique. L'AED n'est pas valide pour la mesure de la douleur. La baisse d'AM suggérerait un comportement de douleur. Les études étaient exploratoires pour les échelles de douleur en raison de leur niveau (débutant) de développement et du manque d'informations sur les qualités métrologiques de ces mesures.

Mots-clés : Douleur, métrologie, douleur chirurgicale, arthrose, bovin, chien, échelles de douleur, vidéo-analyse, analyse de la démarche, sensibilisation.

Abstract

Pain is a multidimensional experience involving sensitive, emotional and cognitive components. Theoretically, there are multiple methods by which pain can be assessed including sensitive, behavioural, physiological, or neurophysiological measurements. However, little work has been done to validate these measurements in veterinary medicine. The presented research program including both Master and Doctorate works was intended to address partially this paucity of research. For this purpose, our work would validate some behavioural and physiological methods of pain assessment by contrasting pain expressions (cows and dogs) in painful animals (negative control) and animals treated with preventive analgesic or curative treatment following surgery-induced (bovine visceral and canine orthopaedic models) pain or natural occurring disease (osteoarthritis in dog).

A pain study was first conducted to compare measurements of placebo treated-cows with postoperative analgesic treated-cows during 21 days following surgical induction of sustained visceral pain. Placebo treated-cows were found to have increased pain sensitization and decreased concentration of cerebrospinal fluid noradrenaline and transthyretin, less motor activity (but higher than in analgesic groups), more restlessness recorded with video-analysis and increased partially stress with measurement of electrodermal activity (EDA). This first study allowed a selection of methods of interest for pain evaluation including spinal biomarkers, measurement of sensitization, behavioural recording with video-analysis and motor activity with biotelemetry. Therefore, two canine pain experiments, with use of similar methods of pain assessment presented above, were performed to compare responses to pain between preventive analgesics treated-dogs (opioids and anti-inflammatory drug, study #2) or a bisphosphonate (tiludronate in study #3) with placebo-treated dogs. Only the pain scales were different among the projects. For project #2, analgesic treated-dogs were found to have lower pain scores measured with the so-called 4A-VET postoperative pain scale while simultaneously exhibiting reduction of

EDA response up to 1 hour following trochleoplasty. In addition, the occurrence rate of the spontaneous behaviour ‘Walking with full weight bearing of the operated leg’ recorded with video-analysis, was higher in analgesic treated-dogs when compared with the placebo-treated dogs at 24 hours post trochleoplasty. The pain study #3 was then conducted and demonstrated central sensitization (assessed with quantitative sensory testing and spinal biomarkers) in all control dogs at 56 days post induction of the canine osteoarthritis pain model. Nevertheless, tiludronate treated-dogs were found to have different spinal biomarkers (substance P and transthyretin), decreased peripheral sensitization, more peak vertical force (PVF), which is a kinetic gait parameter, and increased occurrence rate of ‘Walking with full weight bearing of the operated leg’. Interestingly, the central sensitization was associated negatively with PVF and positively with both EDA and ‘Walking with full weight bearing of the operated leg’. Finally, a fourth pain study was conducted to examine whether some of the methods performed validity and sensitivity in clinical condition with osteoarthritic dogs. For this purpose, osteoarthritic dogs were treated with a green-lipped mussel enriched-diet, having both anti-inflammatory and chondroprotective expected activities. The treated-dogs were found to have low pain scores measured with the pain scale for owner named CSOM, increased PVF and motor activity. Indeed, CSOM scores were associated with both PVF and motor activity. Taken together, the results suggest that video-analysis would assess pain expression through objective, predictive and unique evaluation whatever the species or the model, whereas spinal biomarkers are promising. The PVF changes were related to orthopaedic pain. Sensitization appeared to be common to the pathological pain pattern. The EDA was not validated for pain assessment in animals. Decreased motor activity is pain suggestive. Psychometric evaluation of the pain scales remained only exploratory at this (early) stage of development and knowledge of the present pain scales.

Keywords: Pain, metrology, surgical pain, osteoarthritis, cattle, dog, pain scale, video-analysis, gait analysis, sensitization.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé | i |
| Abstract | iii |
| Table des matières | v |
| Liste des tableaux | xvi |
| Liste des figures | xviii |
| Liste des sigles et des abréviations | xxiii |
| Remerciements | xxvi |
| Introduction | 1 |
| 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE | 3 |
| 1.1 État des connaissances de la validité des mesures de la douleur en médecine vétérinaire au début du programme de recherche | 4 |
| 1.2 Les spécificités et les limitations de la mesure de la douleur en médecine vétérinaire | 7 |
| 1.3 Les orientations proposées dans la recherche pour la validation de la mesure de la douleur | 10 |
| 2 RECENSION DE LA LITTÉRATURE..... | 13 |
| 2.1 Les postulats et les principes de la douleur animale | 14 |
| 2.1.1 Les théories et définitions de la douleur animale..... | 14 |
| 2.1.1.1 Théories et définitions générales | 14 |
| 2.1.1.2 Théories et définitions chez l’animal..... | 16 |
| 2.1.2 Les principes et théories de la validation de la mesure | 17 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.1.2.1 | Les principes généraux de la validation des mesures | 18 |
| 2.1.2.2 | Le fondement des échelles de douleur..... | 19 |
| 2.1.2.3 | Les théories psychométriques..... | 20 |
| 2.1.2.4 | Les stratégies et méthodes de la fiabilité et de la validité | 22 |
| 2.1.3 | Synthèse | 28 |
| 2.2 | Les méthodes usuelles de mesure de la douleur | 31 |
| 2.2.1 | Les mesures neurophysiologiques associées à la douleur..... | 31 |
| 2.2.1.1 | La sensibilisation centrale | 31 |
| 2.2.1.2 | Les bio-marqueurs de la douleur d'origine neurologique ou associés à la sensibilisation | 39 |
| 2.2.1.3 | La mesure de l'activité neuronale d'origine centrale | 40 |
| 2.2.2 | Les échelles de douleur | 42 |
| 2.2.2.1 | Les échelles linéaires unidimensionnelles..... | 42 |
| 2.2.2.2 | Les échelles multidimensionnelles et composites | 46 |
| 2.2.3 | L'évaluation comportementale..... | 56 |
| 2.2.4 | La mesure des réponses physiologiques et endocriniennes associées au stress | 62 |
| 2.2.5 | Synthèse | 64 |
| 2.3 | L'évaluation de la douleur sur des modèles bovins et canins de douleur 64 | |
| 2.3.1 | La douleur chez les bovins..... | 65 |
| 2.3.1.1 | L'épidémiologie et les modèles de douleur en espèce bovine..... | 65 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.3.1.2 | Les stratégies de validation des méthodes de mesures de la douleur bovine | 66 |
| 2.3.1.3 | Synthèse sur les méthodes de mesure de la douleur chez le bovin | 73 |
| 2.3.2 | La douleur d'origine articulaire chez le chien..... | 74 |
| 2.3.2.1 | Les mécanismes et les spécificités de la douleur articulaire | 74 |
| 2.3.2.2 | L'évaluation de la douleur articulaire postopératoire..... | 77 |
| 2.3.2.3 | Les évaluations de la douleur causée par l'arthrose chez le chien | 87 |
| 2.3.2.4 | Synthèse..... | 96 |
| 2.3.3 | Caractéristiques de la validation de la mesure de la douleur en médecine vétérinaire | 97 |
| 2.4 | Questions de recherche..... | 99 |
| 2.5 | Hypothèses..... | 100 |
| 2.6 | Objectifs..... | 102 |
| 3 | ARTICLES..... | 104 |
| 3.1 | Article 1..... | 105 |
| 3.1.1 | Contexte de la recherche..... | 106 |
| 3.1.2 | Résumé de l'article..... | 108 |
| 3.1.3 | Interpretive summary – Visceral pain assessment in dairy cow | 111 |
| 3.1.4 | Abstract..... | 111 |
| 3.1.5 | Introduction..... | 112 |
| 3.1.6 | Materials and methods | 115 |
| 3.1.6.1 | Animals..... | 115 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.1.6.2 | Study Design..... | 116 |
| 3.1.6.3 | Surgically Induced TRP..... | 117 |
| 3.1.6.4 | Rescue Analgesia..... | 118 |
| 3.1.6.5 | CSF Biomarkers | 118 |
| 3.1.6.6 | Mechanical Pain Threshold (MPT) | 120 |
| 3.1.6.7 | Spontaneous Behavioural Measurements..... | 121 |
| 3.1.6.8 | Observer-Reported Pain Measures | 122 |
| 3.1.6.9 | Physiological and Pathological Measurements | 122 |
| 3.1.6.10 | Data and Statistical Analyses | 123 |
| 3.1.7 | Results..... | 124 |
| 3.1.7.1 | Rescue Analgesia..... | 124 |
| 3.1.7.2 | CSF Biomarkers | 125 |
| 3.1.7.3 | MPT Sensitivity | 126 |
| 3.1.7.4 | Spontaneous Behavioral Measurements..... | 127 |
| 3.1.7.5 | Observer-Reported Pain Measures | 128 |
| 3.1.7.6 | Physiological and Pathological Measurements | 129 |
| 3.1.8 | Discussion | 131 |
| 3.1.9 | Conclusions..... | 139 |
| 3.1.10 | Acknowledgments | 139 |
| 3.1.11 | References | 140 |
| 3.1.12 | Appendices | 146 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.1.13 | Tables..... | 149 |
| 3.1.14 | Figure legends..... | 152 |
| 3.1.15 | Figures | 155 |
| 3.1.16 | Données additionnelles sur la vidéo-analyse..... | 160 |
| 3.1.16.1 | Méthodologie de la construction et de la mesure de fiabilité de l'éthogramme..... | 160 |
| 3.1.16.2 | Résultats et discussion | 162 |
| 3.2 | Article 2..... | 165 |
| 3.2.1 | Contexte de la recherche | 166 |
| 3.2.2 | Résumé..... | 167 |
| 3.2.3 | Abstract..... | 170 |
| 3.2.4 | Introduction..... | 171 |
| 3.2.5 | Results..... | 173 |
| 3.2.5.1 | Rescue Analgesia..... | 173 |
| 3.2.5.2 | Video Analysis of Spontaneous Behaviors | 174 |
| 3.2.5.3 | Electrodermal Activity | 175 |
| 3.2.5.4 | Pain Scales..... | 176 |
| 3.2.5.5 | Concurrent Validity | 177 |
| 3.2.6 | Discussion..... | 178 |
| 3.2.7 | Methods..... | 187 |
| 3.2.7.1 | Ethics statement, animals and experimental design | 187 |
| 3.2.7.2 | Anesthesia and Surgery Procedures | 189 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.7.3 | Video analysis of the spontaneous behaviors | 190 |
| 3.2.7.4 | Electrodermal activity..... | 190 |
| 3.2.7.5 | Pain scales..... | 191 |
| 3.2.7.6 | Statistical analyses..... | 191 |
| 3.2.8 | Appendices..... | 194 |
| 3.2.9 | Acknowledgments..... | 200 |
| 3.2.10 | Funding Statement..... | 200 |
| 3.2.11 | Author contributions..... | 200 |
| 3.2.12 | References | 201 |
| 3.2.13 | Tables..... | 208 |
| 3.2.14 | Figure legends..... | 214 |
| 3.2.15 | Figures | 215 |
| 3.2.16 | Données additionnelles sur le développement de l'éthogramme en vidéo-analyse..... | 217 |
| 3.3 | Article 3 | 219 |
| 3.3.1 | Contexte de la recherche..... | 220 |
| 3.3.2 | Résumé..... | 222 |
| 3.3.3 | Abstract..... | 225 |
| 3.3.4 | Introduction..... | 226 |
| 3.3.5 | Methods..... | 228 |
| 3.3.5.1 | Dogs and experimental design..... | 228 |
| 3.3.5.2 | Anaesthesia and CCLT surgery | 230 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.3.5.3 | Centralised pain evaluation | 231 |
| 3.3.5.4 | Behavioural data outcomes (gait analysis, VAS, STAPS, SVAPS, and video-analysis)..... | 233 |
| 3.3.5.5 | Physiological data outcomes (EDA, motor activity)..... | 235 |
| 3.3.5.6 | Statistical analysis..... | 236 |
| 3.3.6 | Results..... | 239 |
| 3.3.6.1 | Spinal cord neuropeptides | 239 |
| 3.3.6.2 | Electrical QST sensitisation..... | 239 |
| 3.3.6.3 | Relationship between factors and both the behavioural and physiological evaluations | 240 |
| 3.3.6.4 | Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect..... | 241 |
| 3.3.7 | Discussion..... | 242 |
| 3.3.7.1 | Sensitisation..... | 243 |
| 3.3.7.2 | Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes..... | 246 |
| 3.3.7.3 | Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect | 248 |
| 3.3.8 | Acknowledgements..... | 249 |
| 3.3.9 | Role of the funding sources..... | 249 |
| 3.3.10 | Conflict of interest statement..... | 250 |
| 3.3.11 | Appendices | 250 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.12 | References | 255 |
| 3.3.13 | Table | 263 |
| 3.3.14 | Figure legends..... | 264 |
| 3.3.15 | Figures | 267 |
| 3.3.16 | Additional information: Relationship between PVF and both the behavioral and physiological evaluations | 269 |
| 3.3.16.1 | Methods | 269 |
| 3.3.16.2 | Results | 269 |
| 3.3.16.3 | Discussion and conclusion..... | 270 |
| 3.3.17 | Données additionnelles sur la méthodologie de codage de la vidéo-analyse | 271 |
| 3.4 | Article 4..... | 272 |
| 3.4.1 | Contexte de la recherche | 273 |
| 3.4.2 | Résumé..... | 274 |
| 3.4.3 | Abstract | 276 |
| 3.4.4 | Background | 278 |
| 3.4.5 | Results..... | 280 |
| 3.4.5.1 | Animals..... | 280 |
| 3.4.5.2 | Primary endpoints..... | 281 |
| 3.4.5.3 | Criterion validities | 282 |
| 3.4.5.4 | Exploratory endpoints..... | 283 |
| 3.4.6 | Discussion | 284 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.4.7 | Conclusions..... | 290 |
| 3.4.8 | Methods..... | 290 |
| 3.4.8.1 | Animals..... | 290 |
| 3.4.8.2 | Study design | 291 |
| 3.4.8.3 | Primary endpoints..... | 292 |
| 3.4.8.4 | Exploratory endpoints..... | 294 |
| 3.4.8.5 | Statistical analyses..... | 295 |
| 3.4.9 | List of abbreviations..... | 298 |
| 3.4.10 | Competing interests | 298 |
| 3.4.11 | Author contributions..... | 298 |
| 3.4.12 | Authors' information..... | 299 |
| 3.4.13 | Acknowledgments | 299 |
| 3.4.14 | Endnotes – Glossary | 299 |
| 3.4.15 | References | 300 |
| 3.4.16 | Tables..... | 307 |
| 3.4.17 | Figure legends..... | 311 |
| 3.4.18 | Figures | 313 |
| 3.4.19 | Additional files | 315 |
| 4 | DISCUSSION GÉNÉRALE..... | 317 |
| 4.1 | Synthèse et résumé des résultats de recherche..... | 318 |
| 4.2 | Étude préliminaire de la validation des mesures sur la base d'un modèle de douleur viscérale chez la vache..... | 320 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.1 | La justification du modèle de douleur..... | 320 |
| 4.2.2 | La gestion de la douleur et l'analgésie de secours | 322 |
| 4.2.3 | La justification du choix des méthodes d'évaluation de la douleur ... | 325 |
| 4.2.4 | La validation de la mesure avec l'étude de douleur vache..... | 331 |
| 4.2.5 | Conclusion sur la validité des méthodes pour la continuité du projet | 340 |
| 4.3 | La validation des méthodes de mesure lors de douleur orthopédique chez le chien | 341 |
| 4.3.1 | La justification des modèles de douleur..... | 341 |
| 4.3.2 | La justification des traitements | 345 |
| 4.3.3 | Les qualités métrologiques des méthodes de mesure..... | 348 |
| 4.3.3.1 | Synthèse de résultats de recherche | 348 |
| 4.3.3.2 | La validité des échelles de mesure de la douleur..... | 349 |
| 4.3.3.3 | La vidéo-analyse : une méthode de référence possible pour l'étude de la douleur | 360 |
| 4.3.3.4 | L'activité motrice : une mesure possible du confort | 365 |
| 4.3.3.5 | L'étude cinétique | 367 |
| 4.3.3.6 | La mesure de l'AED n'est pas spécifique de la douleur..... | 369 |
| 4.3.3.7 | La mesure de la sensibilisation : une mesure de référence de la douleur | 372 |
| 4.3.3.8 | La transthyrétine d'origine spinale serait un marqueur de la douleur | 376 |
| 4.3.3.9 | Synthèse..... | 379 |

| | | |
|------------|---|-------------|
| 4.3.4 | Les liens entre les mesures de la douleur orthopédique..... | 379 |
| 4.3.4.1 | La douleur orthopédique induit des troubles de la locomotion et de la boiterie..... | 380 |
| 4.3.4.2 | Le lien entre les mesures et la sensibilisation..... | 383 |
| 4.3.4.3 | La réduction des méthodes d'évaluation | 387 |
| 4.4 | Les points novateurs et les limites du programme de recherche..... | 389 |
| 5 | CONCLUSION..... | 392 |
| 6 | BIBLIOGRAPHIE..... | 396 |
| | ANNEXES..... | xxix |
| | Annexe I – Données complémentaires sur la vidéo-analyse, étude #1..... | xxx |
| | Annexe II – Curriculum Vitae | xxxv |

Liste des tableaux

RECENSION DE LITTÉRATURE

| | |
|--|----|
| Tableau I - Types de fiabilité et description de stratégies de calcul de ces fiabilités* | 25 |
| Tableau II – Description de la stratégie utilisée pour étudier la validité d’un instrument* | 29 |
| Tableau III – Stratégies de fiabilité et de validités de mesures neurophysiologiques..... | 35 |
| Tableau IV - Stratégies de fiabilité et de validité des échelles linéaires..... | 44 |
| Tableau V - Stratégies de fiabilité, validité et réponses aux traitements des échelles de douleur post-opératoire du chien..... | 47 |
| Tableau VI - Stratégies de fiabilité, validité et réponses aux traitements des échelles de douleur chronique du chien..... | 54 |
| Tableau VII - Caractéristiques et différences entre l’observation directe et l’observation par vidéo-analyse | 58 |

ARTICLES

Article 1

| | |
|--|-----|
| Table I - Ethogram of dairy cows behavioral observations (video analysis)..... | 149 |
| Table II - Mixed linear regression models (<i>P</i> -value) for each of the pain outcomes for 12 Holstein cows and results of the planned comparison at baseline | 151 |
| Table III - Fiabilité inter-observateur et intra-observateur | 164 |

Article 2

| | |
|---|-----|
| Table I - Interobserver reliability of the video-analysis..... | 208 |
| Table II - Wald statistics for Type 3 GEE ¹ analyses of video-analysis..... | 210 |
| Table III - Descriptive statistics of spontaneous behavior during video-analysis..... | 211 |

Article 3

Table I - Treatment effect without including the predictors 263

Article 4

Table I - Mean dog coefficient of variation^a on the primary clinical endpoints^b 307

Table II - Client-specific outcome measures (CSOM) 308

Table III - Spearman's rank correlation coefficient of PVF_{BW} in comparison with measures^a 310

Liste des figures

RECENSION DE LITTÉRATURE

Figure 1 - Classification des différentes origines de la douleur à l'animal (adaptée d'après Pergolizzi et al., 2014). 15

ARTICLES

Article 1

Figure 1 - Study design. Timeline shows activities from d -21 through d 21. TRP = traumatic reticuloperitonitis; CSF TTR, NOR = cerebrospinal fluid transthyretin and noradrenaline; MPT = mechanical pain threshold; VAS = visual analog scale; VPS = veterinarian pain scale; TPS = technician pain scale; EDA = electrodermal activity; * = sampling or recording at the corresponding time; (*) data from d 1 to 8 were pooled for the same pain outcome. Analgesia: A = intraruminal acetylsalicylic acid at a dose of 50 mg/kg; T = tolfenamic acid given intramuscularly at a dose of 2 mg/kg; M = epidural morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg; B = subcutaneous butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg; P = placebo. 152

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

h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2. 152

Figure 3 - Relative protein quantification with one-dimensional gel showing the difference in band density between 25 µL of baseline cerebrospinal fluid (CSF) (lane 2, d -7) and 25 µL of postsurgery CSF sample (lane 3, d 21) for a protein approximately 15 kDa (lane 1 = molecular weight standard). 153

Figure 4 - (A) Cerebrospinal fluid (CSF) transthyretin (TTR), (B) CSF noradrenaline, and (C) number of nonsensitive legs by group over time (day). Data are presented as LSM estimates and SE for groups of n = 3 to 5 cows. Letter x denotes a significant difference compared with d -7; letters a-c indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected α level was 0.0023. Results are LSM \pm SE. Group 1 cows (n = 4) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows (n = 5) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows (n = 3) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2. 153

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

acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2. 153

Figure 6 - Visual analog scale (VAS) by group over time. Data are presented as LSM estimates and SE for groups of n = 3 to 5 cows. Time points 0.02 and 0.10 correspond to d 0 at 2 h and 10 h, respectively. At each time point, different letters (a, b) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected α level was 0.002. Results are LSM \pm SE. Group 1 cows (n = 4) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows (n = 5) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows (n = 3) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2. 154

Article 2

Figure 1 - Electrodermal activity. EDA (no unit) by group over time. Data are presented as the median and 75th percentile for groups of n = 5 to 10 dogs over time. At each time point, different letters (higher case (a) or (b)) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected alpha level was of 0.0015. 214

Figure 2 - Pain scales. A) Visual analog scale, B) the 4A-VET pain scale, C) 4A-VETbeh subscale and D) 4A-VETleg subscale by group over time. Data are presented as the median and 75th percentile for groups of n = 5 to 10 dogs at each time points. At each time point, different letters (higher case (a) or (b)) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected alpha level was of 0.0015.... 214

Article 3

- Figure 1** - Effects of vehicle and tiludronic acid (2 mg/kg SC, q2week, starting at D0) on the concentration of (A) substance P and (B) transthyretin in the spinal cord. The results are presented in box plots with medians and interquartile ranges. A star indicates significantly different values between treatment conditions with two-sided Welch's *t*-test at d 56, $p < 0.05$ 264
- Figure 2** - Effects of vehicle and tiludronic acid (2 mg/kg SC, q2week, starting at D0) on the electrical quantitative sensory testing (QST) when stimulus was applied on A) the stifle (QST-stifle); and B) the tail (QST-tail). The results are expressed as the mean + standard error of mean (SEM). # indicates significantly different QST values over time for the same treatment condition, $p < 0.05$ 264
- Figure 3** - Histogram of the least squares means (LSM) estimates + standard error of mean (SEM) derived from generalized linear analyses of: A) 'Walk full' when quantitative sensory testing applied on the stifle (QST-stifle) was predictor, B) Peak vertical force (PVF) when QST applied on the tail (QST-tail) was predictor; C) Electrodermal activity when QST-tail was predictor; D) 'Walk full' when QST-tail was predictor. Different letters indicate significantly different values between vehicle-treated dogs and tiludronate-treated dogs (tiludronic acid, 2 mg/kg SC, q2week, starting at D0), $p < 0.05$ 265

Article 4

- Figure 1** - Evolution of primary clinical endpoints in osteoarthritic dogs fed subsequently with control and green-lipped mussel-enriched diets. A) PVF_{BW} : Peak vertical ground reaction force adjusted to change in body weight (%BW). B) $CSOM_{Med}$: Box plot of the median-value of client-specific outcome measures (score). C) EDA: electrodermal activity. 311

Figure 2 - Evolution of motor activity in osteoarthritic dogs fed subsequentially with control and green-lipped mussel-enriched diets..... 311

Figure 3 - Evolution of a multifactorial questionnaire (MFQ) in osteoarthritic dogs fed subsequentially with control and green-lipped mussel-enriched diets..... 312

Liste des sigles et des abréviations

| | |
|-----------|--|
| 4A-VET | Association vétérinaire pour l'anesthésie et l'analgésie animales |
| ACTH | Hormone adrénocorticotrophine |
| AED | Activité électrodermique |
| AINS | Anti-inflammatoires non stéroïdiens |
| ASIC | <i>Acid-Sensing Ion Channel</i> |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| A β | Fibres A bêta |
| CBPI | <i>Canine Brief Pain Inventory</i> |
| CCI | Coefficient de corrélation intra-classe |
| CGRP | <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> / peptide lié au gène de la calcitonine |
| COX2 | Cyclooxygénase de type 2 |
| CRH | <i>Corticotropin Releasing Hormone</i> / corticolibérine |
| CSOM | <i>Client Specific Outcome Measure</i> |
| Da | Daltons |
| DHA | Acide docosahexanoïque |
| EDS | Échelle descriptive par score |
| EDA | <i>Electrodermal activity</i> |
| EEG | Électro-encéphalographie |
| ENS | Échelle numérique par score |

| | |
|----------------|--|
| EPA | Acide eicosapentanoïque |
| EVA | Échelle visuelle analogue |
| GCMPS | <i>Glasgow Composite Measure Pain Scale</i> |
| H ⁺ | Protons |
| HCPI | <i>Helsinki Chronic Pain Index</i> |
| IASP | <i>International Association for the Study of Pain</i> |
| IL-1 | Interleukine 1 |
| IL-6 | Interleukine 6 |
| IL-18 | Interleukine 18 |
| IMMPACT | Initiative on Methods, Measurement, and Pain Assessment in Clinical Trials |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique |
| Kg | kilogramme |
| LOAD | <i>Liverpool Osteoarthritis in Dogs</i> |
| MFQ | <i>Multifactorial Pain Questionnaire</i> |
| NMDA | <i>N-méthyl-D-aspartate</i> |
| NaV | Canaux sodiques voltage dépendant |
| NF-κB | <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| NGF | <i>Nerf Growth Factor</i> |
| NO | <i>Nitric oxide / oxyde nitrique</i> |
| PEAP | <i>Place Escape/Avoidance Paradigm</i> |
| PfV | Pic de la force verticale |

| | |
|--------------|---|
| PRO | <i>Patient-Reported-Outcome</i> |
| PROMIS | <i>Patient-Reported Outcome Measurement Information System</i> |
| PVF | <i>Peak Vertical Force</i> |
| QoL | <i>Quality of Life</i> |
| QST | <i>Quantitative Sensory Testing / Tests sensoriels quantitatifs</i> |
| r | Coefficient de corrélation |
| RPT | Réticulo-péritonite traumatique |
| SNA | Système nerveux autonome |
| STAPS | <i>Standardized Technician Arthritis Pain Scale</i> |
| SVAPS | <i>Standardized Veterinarian Arthritis Pain Scale</i> |
| TNF α | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| TPS | <i>Technician pain scale</i> |
| TRPV-1 | <i>Transient receptor potential vanilloid type 1</i> |
| TTR | Transthyréline |
| UMPS | <i>University of Melbourne Pain Scale</i> |
| VAS | <i>Visual analogue scale</i> |
| VPS | <i>Veterinary pain scale</i> |
| WDR | <i>Wide Dynamic Range</i> |

Remerciements

En tout premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Pr Éric Troncy, pour son soutien, son ouverture d'esprit et la confiance qui m'a été accordée pour étudier dans un domaine relativement peu exploré en médecine vétérinaire, soit celui de la validation des méthodes de mesure de la douleur. À travers sa présence et ses conseils, Éric Troncy m'a donné beaucoup de liberté dans mes travaux ainsi que de nombreuses opportunités d'élargir les champs d'exploration. Ceci m'a permis d'acquérir une expérience inégalée qui n'aurait pu être possible sans son soutien et sa supervision. Éric est un vrai mentor et un scientifique rigoureux et mon temps passé dans le laboratoire fut un véritable plaisir et une source d'épanouissement personnel.

Je voudrais remercier mon codirecteur, le Dr Jérôme del Castillo, pour son dévouement, son soutien, son ouverture d'esprit et les nombreuses conversations animées et intelligentes. J'ai un profond respect pour toutes ses valeurs partagées au cours du Doctorat.

Je voudrais également remercier tous les collaborateurs et amis qui au cours des études ont montré leur sérieux, leur enthousiasme et leur dévouement dans la réalisation des travaux au sein du laboratoire : Dominique Gauvin, Martin Guillot, Colombe Otis, Maxim Moreau, ainsi que les membres de l'Unité de recherche en arthrose du Centre Hospitalier de Recherche Universitaire de Montréal (CHUM), Dr Jean-Pierre Pelletier et Dre Johanne Martel-Pelletier, Dr Bertrand Lussier, et les techniciennes de l'équipe d'ArthroLab Inc. : Carolle Sylvestre et Pascale St-Onge.

La recherche n'est pas possible sans mécénat, et en ce sens, je voudrais remercier Dr Troncy pour le soutien financier alloué avec les fonds du laboratoire depuis 2005, ainsi que les partenaires de la bourse de recherche en milieu de pratique (BMP) innovation que sont, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG ; #406726) et le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT ; #144812) et l'entreprise ArthroLab Inc. Je remercie également la Faculté des études supérieures de

l'Université de Montréal (Bourse d'excellence d'admission au programme de *Ph.D.*), les compagnies pharmaceutiques Merial (deux prix Merial Canada pour les jeunes chercheurs dans le domaine de la douleur en 2005 et 2009) et Vétoquinol SA (Bourse Vétoquinol Canada pour les études de Maitrise ou de Doctorat dans le domaine de la gériatrie en 2011).

Je voudrais chaleureusement remercier ma famille proche pour leur présence, leur patience et leur support pendant toutes ces années.



À mes parents, mon mari et ma famille pour qui l'amour et le soutien ne sont pas mesurables.

*À mes trois filles, **Anaïs**, **Élise** et **Manon** qui remplissent ma vie de bonheur et qui font que des petits riens de la vie soient si grands à mon cœur.*

A mes amis, de France, du Québec et de Navarre...



Introduction

La validation de la mesure de la douleur a connu un grand intérêt scientifique et clinique durant les dernières années. La motivation pour cette recherche est principalement liée à la nécessité de connaître la validité de l'utilisation de la mesure de la douleur dans le but de choisir une méthode adaptée à la mesure de la douleur dans une condition donnée et sur une population donnée. Au cours des projets de recherche, même si les animaux ne communiquent pas verbalement, on a pu se rendre compte que les animaux manifestent des changements de comportements et d'attitudes en lien avec la présence de la douleur. Ces changements semblaient stéréotypés, simples, peu influencés par l'environnement social, et ayant une cause commune que sont des changements neurophysiologiques d'origine nociceptive mesurés au cours des projets. Même si le présent programme de recherche ne permettait pas de répondre à tous les aspects de la douleur, notamment l'implication du contrôle central de la douleur en lien avec l'émotion et la cognition, on peut considérer que l'objectif de la validité de l'utilisation de méthodes usuelles de la douleur à partir de modèles de douleur viscérale bovine et des modèles articulaires canins est un succès. En se basant sur le paradigme que la perception de la douleur est différente en présence ou en absence d'analgésie, la recherche s'est concentrée sur la validation des méthodes de mesures de la douleur en évaluant leurs capacités à différencier la douleur de l'absence de douleur, en établissant le lien entre les méthodes de mesure et finalement, en sélectionnant les méthodes complémentaires précises, sensibles et valides pour l'étude de la douleur.

Quand le programme de recherche a commencé en 2005, l'étude de la douleur était dominée par la mesure des changements physiologiques liés au stress chez la vache, la mesure des changements du comportement, et à un moindre degré, la mesure de la sensibilisation d'origine nociceptive. Également, quelques échelles de douleur étaient développées chez le chien. Dans la littérature, la motivation pour utiliser de telles méthodes était avant tout de définir le potentiel thérapeutique de traitements analgésiques chez nos

espèces cibles. Cependant, les qualités métriques de la plupart des méthodes de mesure de la douleur n'avaient pas été définies au préalable. La situation a énormément changé depuis le début du programme car des groupes de recherche ont étudié et publié leurs travaux de validation de la mesure de la douleur chez les bovins et les chiens. Ces connaissances se reflètent dans la présentation générale et la discussion de nos résultats de recherche. L'introduction générale décrira les principes généraux de la douleur, des théories et des stratégies de la fiabilité et la validité de la mesure. La validation des méthodes usuelles développées chez les animaux sera présentée en lien avec les mécanismes connus de la nociception et de la douleur. Dès lors, une introduction des modèles de douleur bovins et canins et des mécanismes de douleur associés aux modèles, permettra de situer le potentiel et la validité de l'utilisation des méthodes de mesure, respectivement chez la vache et le chien. Nous finirons par poser les questions de recherche, les hypothèses et les objectifs qui nous permettront d'établir la validité des mesures. Cette présentation générale ne reflètera pas l'état des connaissances au moment où le programme de recherche a commencé mais permettra d'argumenter sur les qualités métriques de méthodes utilisées dans notre programme de recherche. Le corps principal de la thèse se composera de quatre articles. Dans chacun d'eux, ma contribution fut majeure dans la mise en œuvre et la réalisation du projet de recherche (études #1 et #3), la planification statistique et l'analyse des données (études #1 à #4), l'écriture des manuscrits (études #1 à #4), tout ceci sous la supervision du directeur de recherche, Pr Éric Troncy, et du co-directeur de recherche, Dr Jérôme del Castillo. Finalement, la discussion générale intégrera nos découvertes en lien avec les résultats des travaux sur la validation de la mesure de la douleur chez les bovins et les chiens. En se comparant avec les autres résultats de recherche, il est clair que nos travaux défient les dogmes établis en évaluation de la douleur animale. Surtout, ils déterminent la validité de l'utilisation de certaines méthodes d'évaluation de la douleur en démontrant leurs capacités à différencier différentes sévérités de douleur, ce indépendamment de l'espèce et du modèle de douleur.

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 État des connaissances de la validité des mesures de la douleur en médecine vétérinaire au début du programme de recherche

Au début du programme de recherche, la mesure de la douleur chez les animaux de grande taille était une préoccupation (Morton and Griffiths, 1985; Molony and Kent, 1997; Holton et al., 2001; Anil et al., 2002; Anil et al., 2005). La mesure de la douleur chez le chien et le bovin demeurait, et demeure encore, peu étudiée par rapport aux patients humains. En effet, sur la base d'un dénombrement non exhaustif d'articles de recherche sur l'évaluation de la douleur dans le moteur de recherche PUBMED en utilisant les mots clés « *Pain AND Assessment* » appliqués au chien, au bovin ou à l'enfant, le nombre d'articles recensés chez le chien (71 articles avant 2006 pour atteindre 175 articles en avril 2014) et chez les bovins (29 articles avant 2006 pour atteindre 58 articles en avril 2014) demeurent très inférieurs à ceux publiés chez l'enfant (2321 articles avant 2006 pour atteindre 4731 articles en avril 2014). Si le nombre d'articles est 27 et 98 fois plus élevé chez l'enfant que le nombre d'articles identifiés chez le chien et le bovin, respectivement, la nature même des recherches est également très différente. En effet, en médecine vétérinaire, les études reposent essentiellement sur l'efficacité de traitements et la validité des mesures alors qu'en humaine la validation de l'utilisation des mesures de la douleur dans différentes conditions est le principal objectif des articles recensés.

Chez les animaux, il n'y avait pas de mesure de référence pour évaluer la sévérité de la douleur. Des échelles unidimensionnelles (Holton et al., 1998b) et quelques échelles multidimensionnelles permettent de mesurer la douleur du chien alors que les validités de contenu et de construit de ces

échelles n'ont été démontrées qu'au cours du développement de l'échelle (Firth and Haldane, 1999; Holton et al., 2001; Hielm-Björkman et al., 2003; Brown et al., 2007). Chez le bovin, aucune étude de développement et de validation d'échelle de douleur n'a été recensée au début du programme. À l'inverse, le développement d'échelles de douleur en médecine humaine est très avancé en lien avec l'avancée des principes et des méthodes en psychométrie.

Les recommandations pour évaluer la sévérité de la douleur étaient de mesurer les paramètres cliniques, les paramètres physiologiques, comme des marqueurs de l'inflammation, et également de mesurer le stress (Fox et al., 1998; Mellor et al., 2002), communément admis en médecine vétérinaire comme une variable associée à la douleur (Morton and Griffiths, 1985; Molony and Kent, 1997; Holton et al., 2001; Anil et al., 2002; Anil et al., 2005). La domination des mesures physiologiques et endocriniennes, comme la mesure du cortisol plasmatique, et les études de corrélation entre les échelles d'intensité de douleur et les mesures physiologiques étaient un obstacle à la validation de la mesure de la douleur, comme les échelles d'intensité de douleur. En effet, des scores d'intensité de douleur chez un chien en douleur post-opératoire étaient considérés non valides car ils ne corrélaient pas avec les variations cardio-vasculaires, respiratoires et les variations hémodynamiques (Conzemius et al., 1997; Holton et al., 1998a) considérées comme des indicateurs objectifs du stress et de la douleur. Néanmoins, les mesures physiologiques ne sont pas de bons indicateurs de la douleur. Cette observation pose la question du choix du meilleur indicateur de douleur pour valider les échelles de douleur chez l'animal.

La mesure du comportement est une mesure dominante de l'évaluation de la douleur (Morton and Griffiths, 1985) alors que la mesure de

la sensibilisation d'origine nociceptive est moins mesurée. Chez les animaux, malgré une observation directe du comportement, il était jugé difficile de mesurer la douleur. En effet, il était démontré que le changement de comportement ne pouvait être traité comme une évidence de la douleur car le changement de comportement n'était pas corrélé à l'intensité de stimuli nociceptif (Stafford and Mellor, 1993; Lester et al., 1996) ou les changements de comportements étaient dus au stress généré par les conditions des études de douleur (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000). Également, dans certains cas, les changements de posture et de comportements étaient jugés proportionnels au niveau de douleur mais aussi à l'évolution de pathologies chroniques ou encore à de mauvaises conditions de logements qui affectent le bien-être de l'animal, comme les animaux de ferme par exemple (Loeffler, 1986; Zayan, 1986). Le début du programme est marqué par un tournant dans la prise en charge de la douleur en lien avec le développement de guides sur le bien être animal et les guides de bonne pratique d'utilisation des animaux de laboratoire. De nouvelles technologies automatisées comme la vidéo-analyse utilisée chez le rongeur (Roughan and Flecknell, 2004) et le chien (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000) et le monitoring continu ouvrent de nouvelles perspectives d'observation du comportement en absence de l'observateur et d'obtenir des résultats différents de ceux obtenus par observation directe.

En résumé, des recommandations implicites d'experts et des guides d'évaluation de la douleur (Morton and Griffiths, 1985; Molony and Kent, 1997; Holton et al., 2001; Anil et al., 2002; Anil et al., 2005) ont orienté le choix des méthodes de mesure de la douleur jusqu'au début du programme sans preuve de la validité de ces mesures. La validation des méthodes reposait principalement sur la capacité des mesures à différencier des groupes différents en absence ou en présence de douleur et des groupes d'animaux en

douleur avec ou sans traitement analgésique de puissance analgésique différente (validité de construit). Également, l'évaluation des corrélations des multiples mesures (surtout physiologiques et comportementales) permettaient de mettre en évidence les performances des différentes mesures les unes par rapport aux autres (validité convergente).

1.2 Les spécificités et les limitations de la mesure de la douleur en médecine vétérinaire

Chez les patients humains, l'auto-évaluation, sur la base de la communication orale ou écrite est considérée comme une mesure de référence (Herr et al., 2006). A l'instar des patients non communicatifs ou préverbaux, les mesures de la douleur chez les animaux sont réalisées par un tiers (hétéro-évaluation). La mesure de la douleur par un tiers traduit toute la problématique de la validité de l'utilisation d'échelle de douleur car la dite mesure de la douleur n'est peut-être pas le reflet de la douleur perçue. En médecine vétérinaire, l'échelle d'intensité de la douleur n'est pas clairement citée comme une méthode de référence selon les définitions de la douleur animale.

Il a été proposé que la plupart des méthodes développées sont le reflet de notre vision anthropomorphique, ce qui a naturellement conduit à établir des assomptions sur les signes, les symptômes et les conséquences de la douleur de l'animal en lien avec les expériences de la douleur chez l'homme (Wall, 1992; Hansen, 2003). Des échelles unidimensionnelles, calquées sur le format de certaines échelles simplifiées en humaine, étaient peu fiables et valides pour le chien (Holton et al., 1998b). Des échelles de douleur

multidimensionnelles spécifiques à l'animal ont été développées en s'inspirant également d'échelles multimodales développées et validées chez l'homme. L'échelle *Glasgow Composite Measure Pain Scale* (GCMPS) est inspirée de l'échelle *McGill Pain Questionnaire* (Melzack and Torgerson, 1971). L'échelle GCMPS et sa forme réduite (Murrell et al., 2008) sont les échelles des plus étudiées pour leurs propriétés psychométriques chez le chien (Holton et al., 2001). À ce jour, on peut compter plus de 40 articles publiés au niveau international qui ont cités GCMPS et sa forme réduite (décompte en date du 28 avril 2014 dans PUBMED en sélectionnant les articles de recherche). De la validité démontrée par seulement quelques articles (Holton et al., 2001; Morton et al., 2005; Murrell et al., 2008), les organisations réglementaires et les chercheurs ont adopté cette échelle comme une échelle de référence de la douleur postopératoire chez le chien. Pourtant, une analyse non exhaustive suggère que GCMPS différencie mal les chiens en douleur postopératoire et de chiens non en douleur (comparaison de groupes extrêmes), différencie mal les sévérités de douleur et les effets de différents analgésiques entre eux, ou encore la mesure semble sensible à l'effet sédatif des morphiniques ou autres analgésiques (Guillot et al., 2011). Ces arguments seront démontrés en détail dans la recension de la littérature (voir 2.2.2.2). Finalement, des seuils de scores de GCMPS ont été établis pour définir des douleurs perçues critiques (ce qui implicitement suggère une prise en charge) mais ces seuils n'ont pas été validés pour GCMPS (Morton et al., 2005). Ces résultats suggèrent un manque de validation de l'utilisation de GCMPS. Cet exemple montre que les principes de validation des échelles suivent plutôt la théorie classique de la mesure pour laquelle la méthode est valide dans une condition donnée et une espèce donnée. La validation de l'utilisation de la

mesure défendue par l'approche contemporaine de la mesure n'a pas été présentée en médecine vétérinaire.

Quelques milliers d'études expérimentales randomisées et contrôlées ont été publiées depuis 1990 pour étudier la douleur des bovins et des chiens (recherche OVID en novembre 2013 pour les espèces bovines et canines confondues). Comme un tout, ces études montre une multiplicité des mesures de la douleur (Mathews, 2000; Rutherford, 2002; Hellyer et al., 2007) pour des conditions très variées. Cette diversité des mesures et le faible nombre d'études de la douleur limitent l'inférence lorsque l'on compare les performances et la pertinence des résultats des mesures.

La diversité des patients est un obstacle dans l'établissement de la validation des mesures de la douleur. En effet, les espèces, les races, les différences individuelles, mais également la position hiérarchique des animaux dans un groupe social, la capacité à adopter un comportement adapté aux états de stress concurrents à la douleur (comme l'hospitalisation des animaux ou les manipulations) (Sanford J et al., 1985) sont d'autant de causes de variabilité des mesures de la douleur. Également, l'environnement est très diversifié en fonction des espèces (conditions d'élevage, clinique, centre hospitalier, maison de propriétaire, centre de recherche...) car les animaux adoptent des comportements spécifiques à chaque environnement et aux conditions de régie. Ainsi, la validation des instruments de mesure est difficile en raison d'expression de douleur spécifique de l'espèce et d'un manque d'uniformité des conditions de la validation des mesures de la douleur animale.

Le retard et le manque d'investigation dans l'évaluation de la douleur chez l'animal, des guides d'évaluations qui ont longtemps dominé les choix des mesures, le manque de développement d'échelles de douleur fiables et

valides, une validité dans une espèce donnée et une condition considérée comme une preuve de la validation de la mesure, la diversité des espèces et des conditions de douleur et le manque de mesure de référence expliqueraient le peu de données sur la validation de l'utilisation des méthodes de mesure de la douleur.

1.3 Les orientations proposées dans la recherche pour la validation de la mesure de la douleur

La validité des toutes les mesures n'a pas été prouvée pour chaque espèce et pour différentes sources de douleur. Obtenir une approche standardisée ayant une signification clinique et avoir la garantie de la validation de l'utilisation de cette mesure pour la douleur sont un réel besoin en médecine vétérinaire. L'approche contemporaine de la psychométrie relève ce défi et permet de déterminer si les résultats des mesures sont fiables, appropriées et sont réalistes dans un contexte de validation unifié (Goodwin, 2002). Comme la définition de la douleur de l'animal est peu spécifique de la condition douloureuse ou de l'espèce, l'orientation proposée par le programme de recherche est de tester la validation des méthodes identiques selon des conditions de douleur différentes pour des espèces différentes.

En douleur animale, certains auteurs suggèrent que l'analyse des changements du comportement contribueraient à mesurer la douleur dans son ensemble et permettrait de relier les manifestations de la douleur à sa cause (Bateson, 1991; Hawkins, 2002). Cette suggestion est cohérente avec l'influence de la douleur sur le comportement comme défini par Zimmerman et al., (1983) et Molony et al., (1997). Les méthodes de mesures sont surtout

ponctuelles. Il est évident que tous les comportements de douleur ne seront pas exprimés lors d'une mesure ponctuelle, ce qui peut diminuer la validité de la mesure. Dès lors, les méthodes automatisées semblent des approches complémentaires ou de substitution aux mesures ponctuelles usuellement utilisées en médecine vétérinaire en permettant d'observer plus longtemps les animaux. De nouvelles méthodes automatisées permettent d'étudier la douleur en absence de l'observateur (cas de la vidéo-analyse par comparaison à une évaluation directe) ou d'utiliser des mesures de meilleure fiabilité (une évaluation de la boiterie mesurée avec une méthode de mesure de pression de la patte au sol par opposition à l'évaluation subjective de la boiterie ou encore une mesure de la modification de l'activité telle que suivie en continue par actimétrie).

Les échelles de douleur comportementales regroupaient de nombreux problèmes tels que (i) une mesure de la douleur réalisée par un tiers chez les animaux; (ii) un développement et une validation partielle des échelles de douleur basée sur une approche classique de la validation de la mesure, (iii) les échelles de douleur chez l'animal ont été développées en prenant pour exemple des échelles de douleur développées et utilisées en humaine, (iv) un manque de sensibilité de la mesure et (v) la difficulté à définir un niveau de réponse thérapeutique. Il semblait important d'étudier d'autres échelles pouvant atteindre de meilleures fiabilités et validités.

Finalement, le lien de la douleur à la nociception chez des espèces est peu étudié en recherche et semble être déterminant pour relier le mécanisme de la nociception aux expressions de la douleur. La validité de ces mesures peut avoir un champ d'application dans le développement de marqueurs biologiques en recherche et en clinique.

En conclusion, les orientations proposées par ce programme de recherche tendent à apporter des preuves de la validité de l'utilisation de mesure de la douleur pour des mesures communes au chien et au bovin, deux espèces différentes, comme preuve d'un tout unifié pour la mesure de la douleur. Cette validation concerne des mesures usuelles et également des mesures peu connues au début du programme chez ces deux espèces. La validation est supportée par des stratégies de fiabilité et de validité définies selon une approche contemporaine en psychométrie.

2 RÉCENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Les postulats et les principes de la douleur animale

2.1.1 Les théories et définitions de la douleur animale

2.1.1.1 Théories et définitions générales

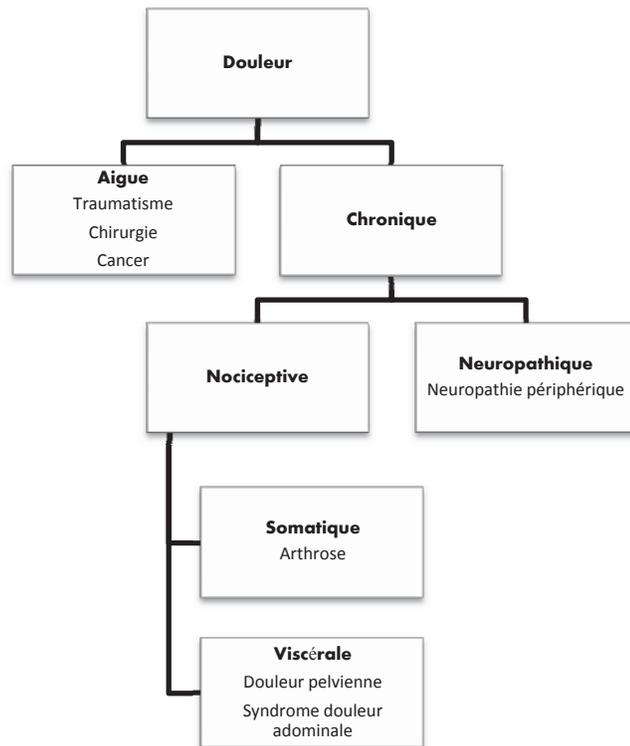
L'évaluation de la douleur se base sur des modèles théoriques. Les premières théories conceptualisaient la douleur comme un arc réflexe sans interaction depuis le stimulus nociceptif douloureux jusqu'à la perception douloureuse. Les théories se sont complexifiées jusqu'à conceptualiser la douleur comme la résultante d'une multitude d'interactions et d'échanges d'informations à plusieurs étages du système nerveux, y compris par un contrôle central de la douleur et par l'implication des composantes émotives et cognitives dans la douleur (Melzack and Wall, 1965; Melzack, 1975).

De ces théories, la douleur est définie selon l'*International Association for the Study of Pain* (IASP) par des composantes nociceptives, émotives et adaptatives, ce qui distingue la douleur de la nociception. Plus particulièrement, la composante nociceptive traduit l'aspect purement physiologique et neuronal de la douleur. La composante sensori-discriminative est associée à la perception subjective de la douleur et traduit l'intensité de douleur (Melzack and Casey, 1968). La composante motivo-affective s'applique à la dimension désagréable de la douleur (Melzack and Casey, 1968). Enfin, la composante comportementale désigne les comportements associés à la douleur. Il est à noter que ces définitions sont

d'ordre général et s'appliquent à toutes les formes et toutes les causes de douleur.

Il existe différentes classifications de la douleur. Selon l'IASP, les douleurs peuvent être définies et classées en douleur aiguë, douleur chronique incluant la douleur nociceptive soit somatique ou soit viscérale et la douleur neuropathique (Figure 1).

Figure 1 - Classification des différentes origines de la douleur à l'animal (adaptée d'après Pergolizzi et al., 2014).



La douleur aiguë est causée par des conditions comme le traumatisme, des procédures chirurgicales, ou des troubles médicaux. Les symptômes

cliniques incluent souvent une augmentation du rythme cardiaque, de la pression artérielle, de la fréquence respiratoire, de l'agitation, des grimaces faciales ou de la rigidité. Les douleurs post-opératoires sont des exemples de douleur aiguë. La douleur nociceptive résulte de dégâts réels ou menaces d'origine non-neurale et est due à l'activation de nocicepteurs localisés au niveau des viscères (douleur viscérale) ou au niveau des tissus comme le tissu musculosquelettique (douleur somatique). La douleur nociceptive causée par un fonctionnement normal du système nerveux somatosensoriel contraste avec la douleur neuropathique qui est causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel. La douleur neuropathique peut être décrite selon des critères cliniques qui sont la démonstration de la lésion neuronale, de maladie avec sensibilisation et des critères diagnostiques neurologiques (par exemple l'imagerie, la neurophysiologie, des biopsies, des tests de laboratoire), ou l'anamnèse d'un traumatisme neurologique évident. La douleur chronique peut être décrite par la persistance de la douleur au-delà de la période de guérison ou encore persistant au delà de 3 à 6 mois. Les définitions de la douleur peuvent être différentes en fonction de la localisation, de la durée... Une récente définition de la douleur chronique ne rapporte pas la douleur chronique à son apparition dans le temps mais suggère que la douleur chronique est liée aux activations de certaines aires du système nerveux central, notamment celles de l'émotion, à l'origine de la 'chronification' de la douleur (Apkarian, 2011; Mansour et al., 2014).

2.1.1.2 Théories et définitions chez l'animal

Chez l'animal, la définition de la douleur diffère quelque peu de celle proposée par l'IASP. La douleur chez l'animal est une expérience sensorielle causée par un dommage tissulaire qui entraîne des réponses réflexes

comportementales, autonomes et un apprentissage vis-à-vis de la condition douloureuse (Zimmermann, 1983). Molony & Kent (1997) ajoutent d'autres perspectives à la définition de la douleur animale en précisant qu'une perte d'intégrité tissulaire ou une telle menace conduit à des changements comportementaux et physiologiques d'évitement ou d'adaptation pour limiter la persistance de la douleur et pour favoriser la guérison. Ces définitions n'ont pas été révisées en médecine vétérinaire. Particulièrement, il n'est pas fait mention de la dimension émotionnelle et cognitive chez l'animal. Toutefois, l'introduction de modèles cognitifs dans des études expérimentales chez les animaux (Fordyce et al., 1968) ainsi que des mesures de conditionnement chez les rongeurs (Novy et al., 1995; Sharp, 2001) marquent bien la volonté d'évaluer la dimension cognitive chez l'animal.

2.1.2 Les principes et théories de la validation de la mesure

Avant toute évaluation de la douleur, il faut s'assurer que la méthode utilisée est apte à mesurer la douleur de façon fiable et valide. Il existe de nombreuses méthodes de mesure de la douleur dont les critères de fiabilité et de validité diffèrent. Certaines méthodes mesurent une variable concrète, par exemple un critère physiologique ou un changement de comportement, comme étant un indicateur de la douleur. D'autres méthodes mesurent la douleur ou la perception sensorielle de la douleur à l'aide d'échelle d'intensité de douleur par exemple. Les mesures de ces échelles de douleur sont des variables abstraites. Si les qualités métriques de l'utilisation d'une mesure concrète sont validées selon les règles d'ingénierie et d'instrumentation, celles des échelles sont guidées par la psychométrie. La psychométrie est un domaine d'ingénierie et de recherche scientifique. Elle est centrée sur des techniques d'observation et de quantification et sur la

modélisation statistique des scores obtenus à l'aide de techniques standardisées (Nunnally and Bernstein, 1994).

En premier temps, nous allons définir les qualités métrologiques d'une mesure qui supportent la validation de l'utilisation d'une mesure. Puis, en partant des caractéristiques des échelles de mesure de la douleur, nous allons développer comment les théories et concepts développées en psychométrie guident la validation des instruments de mesure de la douleur. Ces principes doivent être connus pour interpréter les résultats de mesures et établir la validation des méthodes utilisées en évaluation de la douleur.

2.1.2.1 Les principes généraux de la validation des mesures

La validation d'une méthode est définie par les qualités métrologiques des mesures de la méthode. Selon les critères de classification proposés par Cohen et al., (2008), la confiance accordée à un instrument de mesure dépend d'une description claire de la méthodologie et d'une présentation des caractéristiques métrologiques dûment établies et réitérées au cours d'études indépendantes. Le choix d'un instrument de mesure est donc fonction de sa fiabilité (correspond à l'accord des mesures quand un test est répété), sa validité (correspond au degré d'évidence et de la théorie qui supporte l'interprétation d'une mesure et l'utilisation de la mesure) pour laquelle la sensibilité (aptitude à classer et à différencier les individus) et la spécificité (aptitude à bien mesurer ce que la dimension ou le phénomène prétend mesurer) font partie intégrante de la validité.

La validité et la fiabilité sont deux concepts fondamentaux de l'interprétation d'une mesure. Théoriquement, la fiabilité est libre de l'erreur randomisée (l'erreur ne se répète pas avec la même amplitude si ce n'est par chance) alors que la validité est libre de l'erreur de mesure qui se compose de

l'erreur randomisée et l'erreur systématique (erreur consistante mais inadéquate). La sensibilité d'un instrument permet de détecter des différences minimales qui ressortent des évaluations répétées de la douleur dans les populations cibles. La sensibilité d'un instrument permet de savoir si l'instrument contient des items ou des questions qui mesurent directement le changement pour toute procédure comme, par exemple, un traitement efficace (Dworkin et al., 2011). D'autres propriétés, en dehors du champ de l'approche contemporaine de la mesure, telles que l'interprétabilité (aptitude à donner un résultat compris des autres), l'acceptabilité (capacité à être acceptée par les utilisateurs) et la faisabilité (coût, facilité d'utilisation et d'interprétation) supportent l'utilité clinique des méthodes de mesure (Stevens and Gibbins, 2002).

2.1.2.2 Le fondement des échelles de douleur

En science psychométrique, la variable latente est la représentation d'une hypothèse, nommée « construit » (Nunnally and Bernstein, 1994). Selon Cronbach & Meehl, « un construit est un attribut humain que l'on postule, et dont on suppose qu'il est reflété par la performance au test » (Cronbach and Meehl, 1955). Selon cette perspective, un construit est localisé dans le domaine de la réalité non directement observable mais on fait l'hypothèse d'une réalité quantitative sous-jacente à un instrument de codage numérique des comportements. C'est le cas de la perception douloureuse. Un tel instrument est l'échelle de douleur.

Les échelles de douleur n'ont ni unité de mesure, ni unité étalon et elles se distinguent les unes des autres par leur contenu et leur format. Ainsi, les échelles unidimensionnelles se composent d'une seule question, ou dimension (l'intensité de la douleur, la diminution de la douleur ou le

changement global vis-à-vis de la douleur, par exemple) (Farrar, 2010). Plus couramment, les échelles comportent plusieurs items. Ces items peuvent eux-mêmes représenter un domaine unique (intensité de douleur, par exemple) ou explorer plusieurs domaines (aptitudes fonctionnelles et aptitudes cognitives, par exemple), ce sont les échelles multidimensionnelles. La mesure finale est un attribut (présent ou absent, par exemple) ou une dimension (score) dont la valeur représente ce qui est défini comme, par exemple, l'intensité de la douleur ressentie. Cette mesure est également entachée d'erreur de mesure. L'erreur de mesure n'est pas, à proprement parler, associée à une faute ou à une méthodologie inadaptée mais l'erreur de mesure est plutôt reliée à la définition que l'investigateur donne à l'erreur de mesure. Elle peut provenir de plusieurs sources comme la méthode (contenu, format de la réponse, mode d'administration), le répondant ou l'évaluateur (réponse idiosyncrasique, erreur généralisée) ou la taille d'échantillonnage, par exemple. Ce sont les théories psychométriques qui décrivent les propriétés de la mesure et de l'erreur (Messick, 1989; Nunnally and Bernstein, 1994; Kane, 2001; Borsboom et al., 2004).

2.1.2.3 Les théories psychométriques

Deux théories psychométriques se sont succédées : la théorie classique de la mesure et l'approche contemporaine de la mesure.

Historiquement, la théorie classique de la mesure pose les bases de l'analyse des mesures en psychologie. Pour cette théorie, la validité repose sur l'évidence que l'instrument mesure le construit (ou l'hypothèse) qu'il est censé mesurer. Selon cette théorie, la valeur mesurée est la somme de la vraie valeur et de l'erreur. La vraie valeur n'est jamais connue. La théorie classique de la mesure a favorisé le développement des méthodes mathématiques dans

le but d'interpréter une mesure, d'estimer son erreur et de définir les qualités métriques de cette mesure (Cronbach, 1951; Norman et al., 1997) comme seules garantes de la validité de la mesure. La stratégie de la théorie classique de la mesure est basée sur la triade des validités de contenu, de construit et de critères qui apparaissent comme des caractéristiques propres d'une mesure.

Le concept de validité a évolué. Les récents standards contestent la diversité des validités (la triade des validités de contenu, de construit et de critères) (American Educational Research Association, 1999). La validité de construit est reconnue comme un élément clé et est à la base du concept unique de la validité (Goodwin, 2002; Borsboom et al., 2004). Au contraire de la théorie classique, la théorie contemporaine ne fige pas la recherche mais engage la réflexion vers une amélioration de la mesure et une amélioration des théories qui guident vers une validité de l'utilisation de la mesure. Selon ce courant, les instruments fournissent des mesures qui sont utilisées pour faire des hypothèses et toute validation est un processus qui teste les hypothèses. La validation est un processus qui vise à établir la validité de l'utilisation d'un test ou d'une mesure dans un but précis auprès d'une population spécifique et dans un contexte donné. Les concepts distincts de contenu et de critères de validité sont conservés comme sources d'éléments de preuve de la validité dans la construction de la validité. Également, cette stratégie conduit à s'intéresser aux conséquences de la mesure. Selon l'approche contemporaine de la mesure, la plus forte validité est obtenue lorsque plusieurs considérations sont étudiées, à savoir (Goodwin, 2002; Gélinas et al., 2008; Streiner and Norman, 2008) :

- le contenu (degré pour lequel les mesures représentent le construit sous jacent), ce qui suppose de définir l'univers du contenu et de relier la définition du contenu au but pour lequel le test est utilisé,

- la capacité de réponse (combien la mesure observée est en adéquation avec le construit et combien la mesure n'est pas influencée par un (des) facteur(s) externe(s) non relié(s) à la douleur ?), ce qui répond au degré de la pertinence de la mesure par rapport au construit,
- la structure interne (combien l'évaluation représente le construit d'intérêt), ce qui répond à la performance de la mesure,
- prendre en considération les associations avec d'autres mesures (degré des associations entre les mesures des méthodes), ce qui permet de comparer la performance des tests et décider ainsi si un test peut être substitué par un autre. Cette stratégie permet de prédire les performances d'une méthode de référence basée sur ses résultats de mesure,
- prendre en considération les conséquences des tests.

2.1.2.4 Les stratégies et méthodes de la fiabilité et de la validité

Selon ces théories psychométriques, la fiabilité et la validité sont des concepts distincts dans le processus de la validation de la mesure. Le choix des stratégies et des méthodes de calculs de la fiabilité et de la validité dépendent de la question de recherche.

Le concept de la fiabilité a pour but de déterminer les origines de la variabilité des scores afin d'expliquer les différences de performance des mesures dues aux erreurs de mesure. En effet, les sources de variabilité sont différentes et sont le résultat de l'interaction entre les individus, qui réalisent les tests (nommés observateurs), les instruments et l'environnement. Le concept de fiabilité se base sur les différents points suivants :

- La fiabilité dépend des résultats de la mesure et peut être affectée par différentes sources d'erreur et est exprimée sous forme de coefficient de fiabilité ou d'erreur standard de la mesure.
- Un estimé du coefficient de fiabilité est calculé à l'aide d'indices statistiques.
- Puisqu'il existe différentes sources d'erreur qui peuvent affecter la fiabilité de la mesure, il n'existe pas une seule fiabilité associée à la mesure mais plusieurs fiabilités.
- Un estimé du coefficient de fiabilité peut être évaluée pour différents évaluateurs ou codeurs (fiabilité inter-observateur), pour un même observateur qui évalue à plusieurs reprises le même échantillon (fiabilité intra-observateur), pour deux séries d'évaluation au cours du temps (test-retest), pour l'instrument lui-même lorsqu'il est composé de plusieurs items qui constituent la mesure (consistance interne). Ces différentes fiabilités impliquent différentes méthodes de calcul résumées dans le tableau I.
- De l'ensemble de méthodes de calcul de la fiabilité, celles basées sur l'analyse de la variance fournirait la meilleure stratégie de calcul (Streiner and Norman, 2008) car l'analyse de la variance permet de décomposer les sources de la variance en fonction de la question de recherche posée.
- Le choix de la stratégie de calcul de la fiabilité dépend de l'usage que l'on fait de la mesure. Ainsi, si une mesure est réalisée par un seul observateur mais une partie des mesures est réalisée par d'autres évaluateurs, selon Streiner (2008), si la fiabilité inter-observateur est importante, la fiabilité intra-observateur sera bonne. À l'inverse, lorsque la fiabilité inter-observateur est moins

bonne, la fiabilité intra-observateur doit être vérifiée régulièrement dans le but de déterminer les sources d'erreur de l'observateur principal.

- Finalement, si la fiabilité est essentielle, elle n'est pas une condition suffisante pour attester de la validité des mesures.

Les différentes méthodes proposées pour calculer les coefficients de fiabilités sont bien décrites, mais le choix du seuil de coefficient de fiabilité, situé entre 0 (pas d'accord) et 1 (accord parfait) reste problématique. En effet, les valeurs de coefficient de fiabilité acceptables sont empiriquement décidées et n'ont pas été soutenues par des preuves scientifiques. Pour exemple, il est convenu qu'un coefficient de fiabilité de 0,70 en condition expérimentale et de 0,90 en condition clinique est acceptable (Nunnally and Bernstein, 1994). Si les règles de décision sont empiriques, néanmoins selon Streiner et al., (2008), le choix d'une mesure ayant la meilleure fiabilité est déterminant pour étudier la validité des mesures.

Les différentes méthodes pour tester la fiabilité (Tableau I) génèrent différents types de coefficient de fiabilité et sont une vision simplifiée de la répartition des sources de variabilité. Plus récemment, la théorie de la 'généralisabilité', un modèle statistique basé sur l'analyse de la variance, permet de généraliser les données en vérifiant que les résultats obtenus dans un système peuvent être appliqués à l'ensemble de la population. Ce modèle statistique se fie à la fiabilité des mesures d'une entité définie qui n'est pas forcément l'individu comme dans la théorie classique de la mesure (Cronbach et al., 1972).

Tableau I - Types de fiabilité et description de stratégies de calcul de ces fiabilités.*

| Type | Description de la stratégie | Méthodes |
|---|---|---|
| Fiabilité inter-observateur (fidélité entre juges) | Évaluer l'accord ou la consistance des mesures entre deux ou plusieurs observateurs | Coefficient de corrélation intraclasse ¹ Coefficient Kappa de Cohen ² Coefficient de corrélation ³ |
| Fiabilité intra-observateur (fidélité intra-juge) | Évaluer l'accord des mesures entre deux ou plusieurs séries de mesures opérées à des périodes différentes par le même observateur. Cette mesure est particulièrement indiquée lors d'enregistrements, par vidéo-analyse par exemple, qui peuvent être réutilisés pour refaire les mesures | Coefficient de corrélation intraclasse Coefficient de corrélation ³ |
| Test-retest | Évaluer combien une méthode reproduit des résultats consistants ou cohérents lorsque la mesure est répétée au cours du temps | Coefficient de corrélation |
| Consistance interne | Évaluer à quel point un item qui compose un instrument est un bon indicateur de la performance des autres items qui composent | Coefficient alpha de Cronbach ⁴ Formule 20 de Kuder-Richardson |

*Adapté d'après Nunnally, 1984; Gélinas et al., 2008; Streiner et Normand, 2008

¹ Le coefficient de corrélation intra classe peut être estimé à l'aide des méthodes d'estimation des composantes de la variance et propose de mesurer l'homogénéité des observations au sein des classes d'un effet aléatoire par rapport à la dispersion de ces observations entre classes.

² Le coefficient Kappa de Cohen et le coefficient Kappa pondéré sont des exemples de mesures d'accord sur des mesures non linéaires. Le coefficient Kappa propose de chiffrer l'intensité ou la qualité de l'accord réel entre deux ou plusieurs techniques ou jugements qualitatifs appariés.

³ Le coefficient de corrélation (Pearson ou Spearman) propose de mesurer la relation linéaire entre deux séries de mesures indépendantes.

⁴Le coefficient alpha de Cronbach propose de mesurer la cohérence interne des questions posées lors d'un test (les réponses aux questions portant sur le même sujet devant être corrélées). Le coefficient alpha de Cronbach est conçu pour une généralisation en cas de variables continues ; La formule 20 de Kuder-Richardson (KR-20) est conçue pour des items dichotomiques.

De façon intéressante, la théorie de la ‘généralisabilité’ permet une analyse des sources d’erreur associées à la mesure dans un cadre cohérent alors que la théorie classique présente les composantes de la mesure de façon disparate et sans relation claire entre elles. Ceci est une limite importante de la théorie classique de la mesure.

Selon l’approche contemporaine de la mesure, la validité se réfère à l’association de preuves issues de différentes sources d’évidence (décrites au point 2.1.2.3). La validité est établie à partir d’une procédure qui, par un ensemble d’études, vérifie l’évidence et la théorie qui supportent l’interprétation et l’utilisation des tests.

Les stratégies de la validation s’appliquent aux différentes sources d’évidence de la validité selon l’approche contemporaine (voire 2.1.2.3) (« Évidence » dans le tableau II). La validité distingue différentes démarches : la validation de contenu, la validation de construit et la validation de critères (prédictive et concurrente) (Nunnally and Bernstein, 1994). La validation de contenu concerne la pertinence et la représentativité des éléments qui composent l’instrument au regard de la définition du phénomène mesuré. La validation de construit est une tentative d’élaboration théorique de ce qui est mesuré en faisant l’hypothèse d’une réalité quantitative sous-jacente au score et est étudiée, par exemple, par l’analyse factorielle et l’analyse de la consistance interne. La validation de critères est l’aptitude à relier une mesure à une mesure de référence ou considérée comme telle (Nunnally and Bernstein, 1994; Streiner and Norman, 2008).

D’une façon générale, la stratégie requiert qu’une hypothèse soit testée en fonction du type de validation (« Procédure » dans le tableau II), de

tester ces hypothèses au cours d'une étude qui établit la validité (« propriété psychométrique » dans le tableau II). Un nombre important de méthodes (avis d'experts et méthodes analytiques) permet d'atteindre l'évidence de la validité (« méthodes » dans le tableau II). De cette stratégie, on parlera de la « validité de l'utilisation d'un instrument de mesure dans un but précis, auprès d'une population précise et dans un contexte précis ». Si les résultats des propriétés psychométriques des mesures ne sont pas concluants, on pourra émettre l'hypothèse que l'utilisation de l'instrument n'est pas adaptée à la théorie, ou la théorie n'est pas bonne, ou les deux, théorie et instrument, ne sont pas convenables. Dès lors, la stratégie de la validité est de reposer de nouvelles hypothèses sur la base des observations et des résultats de mesure et de tester de nouveau ces hypothèses.

2.1.3 Synthèse

Nous avons exposé les bases théoriques et les définitions de la douleur, qui n'ont pas changé en médecine vétérinaire depuis Zimmerman et al. (1983), les principes de la validation de la mesure et décrit les concepts et stratégies de fiabilité et validité. L'approche contemporaine en psychométrie redéfinit la validité comme un concept unique. La validité de l'utilisation d'une mesure est basée sur cinq sources d'évidence que sont le contenu, le processus de réponse, le contenu de l'instrument, les associations entre les mesures et les considérations des conséquences des tests (Messick, 1989; Goodwin, 2002; Borsboom et al., 2004). La validation est un processus qui permet de déterminer la validité d'un test dans une population donnée et un contexte spécifique. Un instrument peut se montrer valide auprès d'une population et un contexte donné.

Tableau II – Description de la stratégie utilisée pour étudier la validité d'un instrument*

| Évidence | Procédure | Propriété psychométrique | Méthode |
|---|---|--|---|
| Contenu | Étudie la représentation du construit Hypothèse : Plus l'échantillon testé est représentatif du comportement ciblé, plus le comportement se prête à une meilleure inférence | Validité de contenu; Étudie si le choix des items dans une échelle est approprié | Évaluation d'experts |
| Considération des associations entre les mesures | Étudie la nature des relations entre des variables Établit une hypothèse du niveau de performance attendu de la mesure ce qui permet de décider si un test peut être substitué par un autre (validation concurrente) Établit une hypothèse sur l'utilisation de plusieurs mesures pour lesquelles les avantages d'une mesure peuvent atténuer les faiblesses d'autres mesures (validation prédictive) | Étudie une association entre un instrument dit de « référence » et un nouveau test. Il existe deux types de validités étudiées : -validité concurrente : un nouvel instrument est corrélé avec une mesure de référence -validité prédictive : combien le nouvel instrument prédit le critère mesuré dans le future | Analyse de corrélation Analyse de régression |

| | | | |
|---|---|---|--|
| <p>Construit (Capacité de réponse et structure interne)</p> | <p>Considère des hypothèses associées au construit et teste ces hypothèses en suivant une procédure continue d'études qui révise les hypothèses et les théories en fonction de l'interprétation des résultats des études</p> <p>La validation répond à l'adéquation entre la mesure et la théorie sous-jacente</p> <p>La validation recherche les facteurs qui peuvent influencer la mesure</p> | <p>Teste une hypothèse* par :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Une analyse de la théorie et de la mesure au même moment -La comparaison des groupes extrêmes -L'analyse des corrélations ou association avec d'autres méthodes (validité convergente, discriminante, <i>multitrait-multimethod matrix</i>) ... | <p>Analyse factorielle</p> <p>Analyse de la consistance interne pour les échelles</p> <p>Analyse de comparaisons de groupes</p> <p>Analyse de régression</p> <p>Coefficient de corrélation</p> |
|---|---|---|--|

*Adapté d'après Nunnally, 1984; Gélinas et al., 2008; Streiner et Normand, 2008

2.2 Les méthodes usuelles de mesure de la douleur

À présent, nous allons présenter les méthodes de mesure usuelles développées pour l'étude de la douleur ainsi que les stratégies de fiabilité et de validité associés aux mesures de ces méthodes.

La conceptualisation des différentes théories de la douleur a permis de mieux comprendre la douleur et de développer des méthodes adaptées à sa mesure. Nous décrivons les principales méthodes usuelles de mesure de la douleur qui ont été développées en lien avec les mécanismes neurophysiologiques connus de la douleur. Nous allons également exposer la validité de l'utilisation de ces méthodes, c'est-à-dire à quel point le concept théorique explique et justifie une mesure et que cette mesure confirme et appuie la théorie sous-jacente.

2.2.1 Les mesures neurophysiologiques associées à la douleur

2.2.1.1 La sensibilisation centrale

La sensibilisation est définie comme une réactivité accrue de neurones nociceptifs. La sensibilisation est causée par l'activation de l'axe somatosensoriel et l'excitabilité neuronale au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière voire des centres supérieurs. Les mécanismes d'intégration de l'information nociceptive au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière jouent un rôle prépondérant dans le développement et le maintien de la douleur. D'un point de vue symptomatique, la sensibilisation se caractérise par une réponse neurosensorielle excessive en présence d'un stimulus

nociceptif (hyperalgésie), une réponse neurosensorielle en absence de stimulus nociceptif (allodynie) et des perceptions sensorielles déplaisantes anormales (hypoesthésie / dysesthésie).

La sensibilisation se mesure à l'aide de test nociceptif. Le principe du test nociceptif est d'appliquer un stimulus douloureux sur la peau, à l'aide d'un algésimètre ou algomètre, pour activer les voies de signalisation de la douleur (Le Bars et al., 2001), puis de quantifier la réponse comportementale (intensité de la réponse ou temps de réaction de retrait) ou bien la réponse électromyographique mesurée au niveau d'un muscle cible (Bergadano et al., 2006; van Oostrom et al., 2009).

Les stratégies utilisées pour le développement et la validation de ces mesures de la sensibilisation centrale sont basées sur des études de fiabilité et de validités (Tableau III). De façon générale, lors de développement des méthodes de mesures, la fiabilité est surtout évaluée à l'aide de test-retest dans le but de déterminer si les mesures ne sont pas significativement différentes entre deux temps de mesure (« Fiabilité », Tableau III). La validité est étudiée à l'aide de la comparaison de groupes extrêmes (« Comparaison de groupes extrêmes », Tableau III), et de la comparaison des réponses nociceptives chez des animaux ayant des traitements analgésiques puissants tels que les morphiniques (« Comparaison de groupes analgésiques », Tableau III). Pour la validité convergente, les tests de sensibilité ont été corrélés à d'autres tests de sensibilité ou des mesures du comportement (« Convergente », Tableau III). La validité discriminante permettait de valider la mesure en différenciant la douleur avec d'autres conditions telles que le stress (« Discriminante », Tableau III).

Le test nociceptif a permis de tester expérimentalement l'efficacité antinociceptive des drogues, particulièrement les morphiniques (Machado

Filho et al., 1998; KuKanich et al., 2005; Wegner et al., 2008; KuKanich and Papich, 2011; Hoffmann et al., 2012), de mesurer la sensibilisation suivant une stimulation douloureuse appliquée *de crescendo* (Herskin et al., 2003), lors de douleur postopératoire (Duque et al., 2004; Hancock et al., 2005; Moak et al., 2011), lors de douleur neuropathique (Cashmore et al., 2009) induite par exemple suivant un syndrome de compression au niveau de la colonne vertébrale (Moore et al., 2013) lors de douleur concomitante aux pathologies ayant souvent une composante inflammatoire (Nolan et al., 1987; Brown et al., 2005; Kemp et al., 2008). Si ces résultats suggèrent que la mesure de la sensibilisation est un indicateur de douleur, les preuves de fiabilité sur la base de tests usuels sont rarement établies (« Fiabilité », Tableau III). Finalement, certains auteurs suggèrent que ces tests sont aussi des mesures de reflexe qui infèreraient sur la réponse à la sensibilité nociceptive (Le Bars et al., 2001). En effet, par exemple lors de mesures réalisées chez le bovin, la réponse nociceptive au stress semble se confondre avec celle de la douleur (Machado Filho et al., 1998; Rushen et al., 1999).

Parmi les mécanismes de la sensibilisation, le phénomène de *wind-up* se caractérise par une augmentation progressive de l'activité neuronale en réponse à une stimulation répétée des fibres afférentes de type C (Herrero et al., 2000). Le *wind-up* est la résultante de stimulations nociceptives répétitives de fibres nerveuses de type C à l'origine d'une réponse électrique croissante au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Le *wind-up* provoque une perception douloureuse amplifiée quantifiable à l'aide d'un test de sommation temporelle (Arendt-Nielsen et al., 1994; You et al., 2003). Le test de sommation temporelle permet de mesurer les seuils de tolérance de la douleur nociceptive causée par des *stimuli* nociceptifs d'intensité croissante. La validation de cette méthode a été étudiée expérimentalement chez des

chiens sains (Bergadano et al., 2007). Les tests de sommation temporelle ont démontré une diminution du phénomène de *wind-up* suivant l'administration d'inhibiteur du récepteur *N*-méthyl-D-aspartate (kétamine) chez le chien sain, et d'agents modulateurs de l'activité des canaux calciques voltage dépendants de type $\alpha 2\delta$ (comme la prégabaline ou la gabapentine) (Bergadano et al., 2009; Arendt-Nielsen et al., 2011). Cependant, cette méthode n'a pas été testée chez les chiens ou les bovins en douleur alors que le test de sommation temporelle a démontré la présence de douleur pathologique chez les patients humains (Arendt-Nielsen and Yarnitsky, 2009).

Tableau III – Stratégies de fiabilité et de validités de mesures neurophysiologiques

| Test | Fiabilité | Comparaison de groupes extrêmes | Comparaison de groupes analgésiques | Convergente | Facteurs confondants |
|-----------------|---|--|---|--------------------|-----------------------------|
| Pression | – | Chirurgie invasive < chirurgie moins invasive chez le chien (Hancock et al., 2005) CTL < application de compresse froide sur la plaie chirurgicale du chien (Drygas et al., 2012) | Morphine = morphine et bupivacaïne par voie épidurale chez le chien en douleur post-opératoire (Hoelzler et al., 2005) | – | – |
| von Frey | TEST-RETEST : Pas de différence entre deux temps de mesures (KuKanich et al., 2005; Moore et al., 2013); Accord entre deux séries | Chien avec compression spinale (neuropathie) < chien sain (Cashmore et al., 2001; Moore et al., 2013) | Seuil de sensibilité augmentée avec l'augmentation de la dose d'opioïde chez le chien sain (KuKanich et al., 2005; KuKanich et al., 2011) | – | – |

| | | |
|------------------|--|---|
| d'évaluations : | Chien ayant une résection du ligament croisé = chien sain (Moore et al., 2013) Chien avec douleur articulaire chronique < chien sain (Brydges et al., 2012) | Chien = Chien + kétamine (Bergadano et al., 2007) |
| Mécanique | TEST-RETEST : Pas de différence entre deux temps de mesures (Dixon et al., 2010; Briley et al., 2014) | AINS = CTL, chez des vaches boiteuses (Whay et al., 1998), chez des chiens suivant une chirurgie orthopédique (Moak et al., 2011) Carprofène = carprofène et bupivacaïne, chez des chiens en douleur postopératoire (Bergman et al., 2007; Wagner et al., 2010) CTL < TRPV1 antagoniste, chez chiens cancéreux (Brown et al., 2005) |
| | | Corrélation positive entre le test de von Frey et le test mécanique (r = 0,42) chez des chiens sains (Briley et al., 2014) Corrélation positive entre le score de locomotion et le test mécanique |

| | | | | | |
|------------------|--|--|--|---|---|
| Thermique | <p>INTER-OBSERVATEUR</p> <p>$r = 0,50$ et $0,38$ (2 observateurs, 2 temps de mesure (Herskin et al., 2003)</p> <p>TEST-RETEST</p> <p>Pas de différence entre deux temps de mesure (Bergadano et al., 2009; Hoffman et al., 2012; Williams et al., 2014);</p> <p>Accord entre deux évaluations (test de Bland-Altman) (Williams et al., 2014)</p> | <p>Vache avec mammites < vache sans mammites (Rasmussen et al., 2011)</p> <p>Chien avec arthrose < chien sans arthrose (Williams et al., 2014)</p> | <p>Seuil de sensibilité augmentée avec l'augmentation de la dose d'opioïde chez le chien sain (Kongara et al., 2009; Dixon et al., 2010)</p> | <p>($r = 0,51$) chez des vaches avec boiterie (Laven et al., 2009)</p> | <p>Corrélation positive entre l'intensité de la réponse nociceptive et 1) l'intensité de la réponse du comportement associé au stress (Rushen et al., 1997, Machado et al., 1998) 2) la température de la peau chez la vache (Ting et al., 2010)</p> |
|------------------|--|--|--|---|---|

| | |
|---|----------------------------|
| <p>Éléments</p> <p>Coefficient de corrélation de Spearman;</p> <p>AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien; TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid type 1</p> <p>Morphine > CTL, chez des patients atteints de rhumatisme type 1</p> <p>(réponse électro-myographiques) (Brown et al, 2002)</p> <p>Corrélation positive entre l'intensité de la stimulation électrique et</p> <p>1) l'intensité du retrait de la patte (Bergadano et al., 2011)</p> <p>2) la réponse électromyographique (Brown et al, 2002; Van Oostrum et al., 2009)</p> | <p>–</p> <p>–</p> <p>–</p> |
|---|----------------------------|

r : Coefficient de corrélation de Spearman; AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien; TRPV1 : *Transient receptor potential vanilloid type 1*; > : Sensibilité au test supérieure à; = : sensibilité au test identique à; < : sensibilité au test inférieure à; CTL : groupe contrôle avec administration de substance placebo; _ Absence de données

2.2.1.2 Les bio-marqueurs de la douleur d'origine neurologique ou associés à la sensibilisation

La sensibilisation est le reflet des changements chimiques au niveau du système nerveux périphérique, médullaire et central. L'évaluation objective de la douleur chez les animaux a inclus le dosage de bio-marqueurs (ou marqueurs biologiques) d'origine neuronale impliqués dans la perception douloureuse (Basbaum et al., 2009; Latremolière and Woolf, 2009). Ce sont :

- des neuromédiateurs pronociceptifs (des neuropeptides tels que la substance P et la *calcitonin gene-related protein* [CGRP], des acides aminés excitateurs tels que le glutamate et l'aspartate),
- des neuromédiateurs antinociceptifs (opioïdes endogènes, acide γ -aminobutyrique, glycine, noradrénaline, sérotonine, adrénaline, somatostatine, galanine),
- des agents révélateurs de l'activité neuronale (des neurotrophines tels que le *nerf growth factor* [NGF], des facteurs de transcription tels que c-Fos, des facteurs dérivés des cellules gliales),
- ainsi que des bio-marqueurs de la réponse du système nerveux autonome (SNA) (cortisol, catécholamines, vasopressine).

Également, des acteurs de l'inflammation (cellules immunitaires, cytokines pro-inflammatoires telles les interleukines [IL-1, IL-6, IL-18], le *tumor necrosis factor-alpha* [TNF α], chimiokines, éicosanoïdes, bradykinine), des facteurs de transcription (*nuclear factor-kappa B* [NF- κ B]) et des acteurs du stress tissulaire (adénosine triphosphate [ATP], *nitric oxide* [NO], protons [H⁺]) (Pelligrino et al., 1996) participent également à la sensibilisation neuronale.

Une étude clinique récente montre l'avantage de tracer certains bio-marqueurs telle que la substance P, comme une "signature" cérébrale fonctionnelle de la douleur neuropathique (Hu et al., 2012). Néanmoins, les bio-marqueurs sont les acteurs d'un ensemble d'interactions chimiques (Basbaum et al., 2009; Latremolière and Woolf, 2009; Seybold, 2009) dont la mesure ne témoigne que d'une partie du mécanisme neurophysiologique de la douleur.

Ces bio-marqueurs semblent intéressants pour étudier la douleur. En médecine vétérinaire, le dosage de bio-marqueurs d'origine céphalorachidienne comme mesure de la douleur est peu investigué (Eisenach et al., 1996; Orendáčová et al., 1999; Kobayashi et al., 2005). Surtout, la fiabilité et la validité de telles mesures n'ont pas été étudiées chez les bovins et les chiens.

2.2.1.3 La mesure de l'activité neuronale d'origine centrale

Les activités neuronales d'origine spinale et supra-spinale traduisent les mécanismes d'intégration et de modulation de la douleur au niveau central. Les modèles de douleur nociceptive et neuropathique ont démontré l'implication des aires somatosensorielles à l'origine des intensités de douleur, le rôle des zones corticales et sous-corticales (cortex insulaire, cortex cingulé antérieur, amygdale striatum, aires préfrontales) comme source de la nature émotionnelle de la douleur, l'activité des centres de modulation (thalamus et hypothalamus) ayant une forte contribution dans la réponse neuroendocrine de la douleur, et les centres du cervelet (substance grise périaqueducale, *locus caeruleus*, noyau du tractus solitaire, aire parabrachiale, neurones contenant les catécholamines) ayant une importante contribution dans les modulations descendantes de la douleur (Saadé and Jabbur, 2008;

Jaggi and Singh, 2011; Zhuo, 2011). L'ensemble de ces voies de signalisation compose la 'matrice de la douleur'.

Différentes méthodes peuvent mesurer l'activité neuronale comme des témoins de l'intégration et de la modulation de l'information nociceptive au niveau central. Il existe des méthodes de neuroimagerie qui permettent de réaliser des mesures :

- anatomiques, métaboliques et fonctionnelles (radiologie, imagerie par résonance magnétique [IRM]),
- pharmacologiques (tomographie par émission de positons),
- et neurophysiologiques en étudiant les voies de signalisation et les activités moléculaires associées à la douleur (tomographie par émission de positons ciblée) (Apkarian et al., 2005; Stephenson and Arneric, 2008).

Ces technologies ne sont pas appliquées couramment en médecine vétérinaire.

Une autre méthode neurophysiologique comme l'électroencéphalographie (EEG) est depuis peu utilisée chez les chiens et les bovins pour l'étude de la douleur. Les potentiels évoqués reflètent l'activité électrique du cerveau avec une haute résolution. Cette activité électroencéphalographique est reliée aux composantes fonctionnelles et structurelles de l'expérience douloureuse. La fiabilité de la mesure n'a pas été testée. L'activité EEG est corrélée avec la cortisolémie plasmatique chez le veau castré (van Oostrom et al., 2009; Bergamasco et al., 2011) (validation convergente). La validation de construit a été approchée en étudiant des chiennes ayant une ovariectomie. La stratégie est basée sur la différence de signal EEG entre des chiennes traitées au tramadol et des chiennes traitées à

la morphine en plus d'acépromazine et atropine (Kongara et al., 2011; Kongara et al., 2013). Également la validité de convergence a été étudiée par la corrélation entre le signal EEG et le score de douleur de GCMPS (Kongara et al., 2011; Kongara et al., 2013).

2.2.2 Les échelles de douleur

2.2.2.1 Les échelles linéaires unidimensionnelles

Des échelles linéaires unidimensionnelles telles que l'échelle descriptive par score (EDS), l'échelle numérique par score (ENS) et l'échelle visuelle analogue (EVA) ont été utilisées en médecine vétérinaire (Welsh et al., 1993; Lascelles et al., 1997; Holton et al., 1998a; Holton et al., 1998b). Les échelles linéaires mesurent souvent une seule dimension de la douleur, généralement l'intensité de celle-ci. Certaines échelles mesurent la douleur pour des conditions particulières, comme la douleur associée à la boiterie ou la douleur d'origine postopératoire (Tableau IV).

Pour les échelles à une dimension, différentes stratégies ont été appliquées pour établir la fiabilité et la validité de ces échelles (Tableau IV). Une unique dimension simplifie les procédures de validation de la mesure et ne concerne pas toutes les stratégies présentées dans le tableau II (voir 2.1.2.4). Par exemple, l'analyse de la consistance interne et la validité de contenu de l'échelle ne sont pas applicables. Les stratégies d'étude des qualités psychométriques d'EVA, ENS et EDS sont présentées dans le tableau IV. Une validation de construit était basée sur la capacité à identifier trois niveaux de douleur chez des chiens évalués à trois temps différents après la chirurgie pour les EVA, ENS et EDS (Holton et al., 1998b). Holton et al., (1998b) ont démontré que l'EVA, l'ENS et l'EDS sont peu fiables,

particulièrement l'EDS et l'ENS. L'EVA différencie mieux des intensités de douleur au cours du temps que l'EDS et l'ENS chez des chiens en douleur postopératoire (Holton et al., 1998b).

Des études de validation convergente rapportent la corrélation de différentes échelles d'intensité ou encore des échelles d'intensité de douleur avec des échelles de boiterie lors de douleur orthopédique (Tableau IV). Des études de validation convergente montrent que les échelles linéaires présentent de mauvaises qualités métriques lorsqu'il s'agit d'évaluer l'intensité de la douleur aiguë postopératoire (Holton et al., 1998b). Une étude de validation convergente a montré que l'EVA et la sensibilité mécanique sont corrélées chez les chiens en douleur postopératoire (Lascelles et al., 1997). Néanmoins, les corrélations de Spearman entre l'EVA et les composantes des échelles de douleur chronique sont inexistantes à faible ($r = 0,01 - 0,06$) (Hielm-Björkman et al., 2009). Les corrélations de Spearman entre l'EVA et des scores de la douleur associée à une boiterie sont bonnes chez le mouton (Welsh et al., 1993) et faibles chez le chien arthrosique (Hudson et al., 2004). Ces résultats inconsistants remettent en question la validité de l'utilisation des échelles linéaires comme l'EVA, l'ENS ou l'EDS.

Tableau IV - Stratégies de fiabilité et de validité des échelles linéaires

| Échelle | Fiabilité | Validation de convergence INTENSITÉ DE DOULEUR | Validation de convergence INTENSITÉ DE BOITERIE |
|----------------------------------|---|--|--|
| | <p>INTER-OBSERVATEUR :</p> <p>ICC = 0,47 lors de douleur orthopédique chez le chien (Quinn et al., 2007)</p> <p>$r = 0,73, -0,77, -0,77$ (3 observateurs), lors de douleur orthopédique chez le chien (Quinn et al., 2007)</p> <p>Kappa = 0,67 à 0,90 lors de douleur orthopédique chez le chien arthrosique (Waxman et al., 2008)</p> <p>INTRA-OBSERVATEUR :</p> <p>$r = 0,41$ à $0,91$ sur des mesures de boiterie par vidéo (Waxman et al., 2008)</p> | <p>Diminution des scores de douleur post-opératoire en même temps que la diminution de la sensibilité mécanique chez des chiens traités à la péthidine (Lascelles et al., 1997)</p> <p>Pas de corrélation entre EVA et une échelle composite de douleur lors d'arthrose canine (Hielm-Björkman et al., 2011)</p> <p>Kappa < 0,40 entre EVA et des changements de comportements chez des chiens en douleur post-opératoire (Väisänen et al., 2004)</p> | <p>Corrélation entre EVA et PFV ($r > 0,7$) sur des évaluations de boiteries chez des chiens arthrosiques (Hudson et al., 2004)</p> <p>Pas de corrélation entre EVA et PFV sur des évaluations de boiteries chez des chiens arthrosiques (Quinn et al., 2007; Waxman et al., 2008)</p> |
| Échelle visuelle analogue | | | |

| Echelle numérique de score | INTER-OBSERVATEUR : | Pas de corrélation entre ENS et EVA chez le chien en douleur post-opératoire (Holton et al., 1998b) | Pas de corrélation entre ENS et PFV chez le chien en douleur orthopédique (Conzemius et al., 1997; Quinn et al., 2007) Corrélation entre EVA et ENS pour 2 observateurs lors de boiterie induite chez le mouton ($r = 0.95$ et $r = 0.94$) (Welsh et al., 1993) |
|----------------------------|--|--|--|
| score | <p data-bbox="535 525 730 693">ICC = 0,51 (3 observateurs) lors de douleur orthopédique (Quinn et al., 2007)</p> <p data-bbox="535 693 730 945">Pas de différence entre les scores de douleur orthopédique du mouton par 2 observateurs (<i>Wilcoxon signed-rank</i>) (Welsh et al., 1993)</p> | <p data-bbox="535 945 730 1113">Pas de corrélation entre EDS et EVA, chez le chien en douleur post-opératoire (Holton et al., 1998b)</p> | |
| Echelle descriptive de | <p data-bbox="730 525 925 693">INTER-OBSERVATEUR :</p> <p data-bbox="730 693 925 945">$r = 0,29$ à $0,36$ (3 observateurs) chez le chien lors de douleur post-opératoire (Holton et al., 1998b)</p> <p data-bbox="730 945 925 1197">Kappa = $0,21$ à $0,40$ (Holton et al., 1998b)</p> <p data-bbox="730 1197 925 1365">TEST RETEST :</p> <p data-bbox="730 1365 925 1900">$r < 0,50$ (Holton et al., 1998b)</p> | | |

ICC : Coefficient de corrélation intraclasse; r : Coefficient de corrélation de Spearman; EVA; Échelle visuelle analogue; ENS : Échelle numérique de score; EDS : Échelle descriptive de score; PFV : Pic de la force verticale; > : supérieure à; = : identique à; < : inférieure à.

2.2.2.2 Les échelles multidimensionnelles et composites

Des échelles multidimensionnelles et composites mesurent différentes dimensions et sont préférées aux échelles unidimensionnelles car, par définition, la douleur affecte différentes dimensions (Melzack and Wall, 1965). Chez les animaux, les items rapportent les changements physiologiques et comportementaux comme étant les critères de douleur (Firth and Haldane, 1999) ou uniquement comportementaux (Holton et al., 2001; Brown et al., 2009). Les critères retenus sont spécifiques des espèces. Il n'y a pas d'échelle de douleur développée chez les bovins mais une liste de comportements associés à la douleur suivant une castration, l'écornage chez le veau (Sanford J et al., 1985; Molony et al., 1995; Molony and Kent, 1997; Schwartzkopf-Genswein et al., 1998; Heinrich et al., 2010; Mialon et al., 2012) et associés à la mammite, la boiterie et la chirurgie abdominale chez la vache (Kemp et al., 2008; Mialon et al., 2012; Fitzpatrick et al., 2013). Ces listes de comportements n'ont pas été testées pour leurs fiabilités et leurs validités. Des échelles multidimensionnelles et composites ont été développées et conceptuellement validées chez le chien (Holton et al., 1998; Firth and Haldane, 1999; Holton et al., 2001). Les stratégies de fiabilité et de validité des échelles multidimensionnelles sont différentes de celles des échelles unidimensionnelles. L'analyse psychométrique requiert en particulier de tester la consistance interne, le contenu et le construit des échelles multidimensionnelles. Les autres stratégies sont identiques aux stratégies développées pour l'étude de la fiabilité (Tableau II) et la validité (Tableau III).

Tableau V - Stratégies de fiabilité, validité et réponses aux traitements des échelles d'intensité de douleur post-opératoire du chien

| Échelle | Composition | Fiabilité¹ | Validité¹ | Sensibilité² |
|---|--|--|---|--|
| Glasgow Composite Measure Pain Scale | 8 domaines : Posture, Activité, Vocalisation, Attention à | Cronbach α : 0,60 à 0,80 (8 domaines) | <u>Validation de contenu</u> (experts) <u>Validation de construit</u> | CTL > morphine = kétoprofène = nalbuphine (Wagner et al., 2008) Kétoprofène = tramadol (Morgaz et al., 2013) |
| et sa forme révisée : échelle simplifiée (Holton et al., 2001; | l'environnement, Humeur, Mobilité, Réponse au toucher | | (analyse factorielle n = 77, comparaison de groupes extrêmes : n = 40 chiens sans chirurgie et n = 37 chiens avec chirurgie; capacité à mesurer la douleur post-opératoire chez le chien; n = 122 chiens) | Kétoprofène > buprénorphine (Morgaz et al., 2013) Carprofène < buprénorphine (Shi et al., 2008) CTL = infiltration bupivacaïne (Fitzpatrick et al., 2010) |
| Morton et al., 2005; | | | <u>Validation de convergence</u> (corrélation avec une échelle descriptive simplifiée : n = 77 chiens) | CTL = gabapentine (Wagner et al., 2010) Carprofène = morphine (Dzikiti et al., 2006) |
| Reid et al., 2007) | | | | Robenacoxib = méloxicam (Gruet et al., 2010) Radiation (Carsten et al., 2008) OVE = OVH (Peeters et al., 2010) |

| | | | | |
|---|--|---|---|--|
| <p>University Melbourne Pain Scale (Firth and Haldane, 1999) et sa forme révisée</p> | <p>(Physiologique), Vocalisation de l'intérieur et de l'extérieur de la cage, Posture, Activité, État mental, Réponse à la palpation</p> | <p>Méthode de Bland-Altman pour l'évaluation intra-observateur (vidéo-analyse) et inter-observateur, (n = 2 observateurs)</p> | <p><u>Validation de construit</u> (différence entre les groupes extrêmes : n = 36 chiennes ovariectomisées et divisées en 3 groupes de traitement (morphine, carprofène et placebo)</p> | <p>CTL > buprénorphine (Moll et al., 2011) CTL = gabapentine (Wagner et al., 2010) Fentanyl = buprénorphine (Moll et al., 2011)</p> |
| <p>Échelle 4A-VET (Labois-sière, 2006)</p> | <p>Intensité de douleur, Attitude générale, Comportement interactif, Physiologique, Sensibilité à la palpation</p> | <p>Cronbach α : 0,81 Test-retest : Corrélation de Spearman Fiabilité inter-observateur : $\kappa = 0,71$ à 0,91 (n = 3 observateurs)</p> | <p><u>Validation de construit</u> (différence entre les groupes extrêmes; comparaison de groupes de paliers analgésiques (n = 55) Analyse des facteurs confondants (effet de la morphine) de la mesure de la douleur <u>Validation de convergence</u> (corrélation avec échelle descriptive n = 55) chez le chien en douleur post-opératoire)</p> | <p>CTL > anesthésie locorégionale (Wenger et al., 2005) CTL > électro-acupuncture (Laim et al., 2007) CTL = kétamine (Sarrau et al., 2007)</p> |

¹ Stratégies de fiabilité et de validité réalisées dans la cadre du développement et de la validation de l'utilisation des échelles d'intensité de douleur post-opératoire chez le chien. ² Résultats d'études d'utilisation des échelles suivant la comparaison de différents groupes de traitement en condition expérimentale randomisée chez des chiens en douleur post-opératoire suivant une chirurgie orthopédique ou une chirurgie de tissus mous. CTL : Groupe contrôle avec administration de substance placebo; OVE : Ovariectomie; OVH : Ovariohystérectomie; > : Score supérieur à; = : Score identique à.

Pour la douleur aiguë, surtout postopératoire (Firth and Haldane, 1999; Wenger et al., 2005), les échelles évaluent l'intensité de la réponse à la palpation ou la manipulation, des comportements associés à la détresse et à l'inconfort, des comportements interactifs entre l'animal et l'évaluateur et des changements des paramètres physiologiques et cliniques (Tableau V). Quelques échelles de douleur postopératoire ont satisfait aux critères de fiabilité et de validité. Ces échelles sont l'échelle *Glasgow Composite Measure Pain Scale* (GCMPS) (Holton et al., 2001; Reid et al., 2007), l'échelle *University of Melbourne Pain Scale* (UMPS) (Firth and Haldane, 1999) et l'échelle composite de l'Association vétérinaire pour l'anesthésie et l'analgésie animales (4A-VET) (Verwaerde and Estrade, 2005; Laboissière B., 2006) (Tableau V). La validité de ces échelles est supportée par une augmentation des scores de douleur chez des chiens lors de chirurgie et de traumatisme par comparaison à des chiens normaux (Morton et al., 2005). Également, les scores de douleur postopératoire diminuaient chez des chiens suivant l'administration d'opioïde (Wagner et al., 2008; Moll et al., 2011), d'anesthésies loco-régionales (Wenger et al., 2005) et lors d'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Wagner et al., 2008) par comparaison à des chiens non traités. Même si ces échelles de douleur sont reconnues comme des outils fiables et valides, ces échelles ont une réponse au traitement modérée. En effet, 4A-VET et GCMPS ne différenciaient pas l'effet analgésique de la kétamine et de la gabapentine, respectivement, par comparaison à des chiens non traités (Sarrau et al., 2007; Wagner et al., 2010). Également, GCMPS ne différenciait pas les effets analgésiques des AINS de ceux des opioïdes (Dzikiti et al., 2006; Wagner et al., 2008), du placebo des effets analgésiques de l'infiltration de bupivacaïne (Fitzpatrick et al., 2010) ou présentait des résultats discordants entre des chiennes

ovariohystérectomisées traitées avec des morphiniques et des chiennes ovariohystérectomisées traitées avec des AINS (Shih et al., 2008; Morgaz et al., 2013), ou par comparaison de techniques chirurgicales différentes (Peeters and Kirpensteijn, 2011) ce qui suggère une réponse au traitement modérée de GCMPS vis-à-vis des différentes classes analgésiques (Tableau V). Finalement, certains travaux rapportent que les instruments GCMPS et 4A-VET sont sensibles à l'activité neuroleptique et sédatif des drogues analgésiques (Laboissière B., 2006; Shih et al., 2008; Guillot et al., 2011), la dernière étude citée démontrant que la GCMPS est plus biaisée par les effets sédatifs que la 4A-VET (Guillot et al., 2011).

Tout comme pour la douleur aiguë, des échelles de douleur chronique ont été développées chez le chien (Tableau VI). Il existe des échelles génériques de la douleur chronique (*Canine Brief Pain Inventory* [CBPI]) (Brown et al., 2007), des échelles de douleur associées à une pathologie, telle que l'arthrose (*Helsinki Chronic Pain Index* [HCPI], *Visual analogue scale questionnaire*, *Liverpool Osteoarthritis in Dogs* [LOAD]) (Hielm-Björkman et al., 2003; Hudson et al., 2004; Brown et al., 2007; Hercocock et al., 2009; Hielm-Björkman et al., 2009; Walton et al., 2013) (Tableau VI). Les échelles de douleur chronique évaluent majoritairement les incapacités fonctionnelles, telles que les activités journalières, les troubles émotionnels et cognitifs (Hielm-Björkman et al., 2003; Brown et al., 2009) et l'intensité de la douleur (Brown et al., 2007). Le contenu de ces échelles de douleur chronique chez le chien suit en partie les recommandations de *Initiative on Methods, Measurement, and Pain Assessment in Clinical Trials* (IMMPACT) qui encouragent, entre autres, la mesure de l'intensité de la douleur, de la fonction physique, des troubles émotionnels et de l'effet des traitements (Dworkin et al., 2005) pour mesurer la douleur.

Les développements des instruments CBPI, HCPI et LOAD suivent les règles de la psychométrie classique depuis l'identification d'items, le tri des items, l'évaluation de la fiabilité et de la validité interne de la grille et l'évaluation de la validité de construit en comparant les scores des chiens en douleur chronique avec ceux des chiens qui ne sont pas en douleur (Tableau VI). La sélection des items est différemment approchée entre les instruments. Pour CBPI et LOAD, un panel d'experts a défini les comportements les plus indicateurs de la douleur chronique (Brown et al., 2007; Hercock et al., 2009). Pour HCPI, les items ont été définis par des propriétaires de chiens arthrosiques au cours d'interviews, puis les items ont été révisés par un panel d'experts (Hielm-Björkman et al., 2009). Des tests de fiabilité, des analyses factorielles, des tests de comparaison de groupes extrêmes et des tests de corrélation avec des instruments de mesure de la qualité de vie ont permis de soutenir la fiabilité et la validité des instruments de mesure de la douleur chronique lors de leurs développements (Tableau VI). L'évidence de la validité de tels instruments est majoritairement basée sur la comparaison des scores de chiens arthrosiques par comparaison à des scores de chiens non arthrosiques. Si ces instruments sont établis comme des outils fiables et valides, des études récentes ont réévalué les qualités psychométriques des instruments CBPI, HCPI, et LOAD sur de grandes populations canines (Hielm-Björkman et al., 2003; Walton et al., 2013). La validation de construit (analyse factorielle et corrélation) réalisée sur ces échelles n'a pas confirmé la validité de construit établie lors du développement de HCPI (Hielm-Björkman et al., 2011) et CBPI (Brown et al., 2007), mais les échelles CBPI, HCPI et LOAD sont corrélées entre elles (Walton et al., 2013)

Les échelles de douleur donnent beaucoup de crédit aux changements des comportements observés par les propriétaires de chiens (Gingerich and

Strobel, 2003; Hielm-Björkman et al., 2003). Certains auteurs ont utilisé une échelle de douleur composée de comportements propres à chaque chien et définis selon le propriétaire du chien (Gingerich and Strobel, 2003; Lascelles et al., 2008). Cet instrument, nommé *Client Specific Outcome Measure* (CSOM) est construit par le propriétaire du chien et tient compte de la capacité du propriétaire à identifier les changements de comportements du chien reliés à la douleur. Dans ce cas, le contenu des échelles est très différent d'un chien à l'autre. D'un point de vue psychométrique, la différence de construction des échelles n'est pas supportée par l'analyse de construit (Streiner and Norman, 2003). Il est par conséquent difficile de déterminer les qualités psychométriques de CSOM.

En résumé, la mesure de la douleur à l'aide d'échelle est très répandue en médecine vétérinaire. Les échelles de douleur sont principalement construites sur la base de changements de comportements associés à la douleur. Le contenu des échelles est différent d'un instrument à l'autre. Ceci suggère l'absence de consensus à définir les comportements liés à la douleur et à uniformiser la mesure. Parmi les échelles de douleur canine, citées ci-dessus, certaines ont satisfait aux règles psychométriques lors de leur développement. Par contre, il manque encore toute une analyse de validation de l'utilisation de ces échelles. Pour les bovins, il n'y a pas d'échelle de douleur validée à ce jour.

Tableau VI - Stratégies de fiabilité, validité et réponses aux traitements des échelles d'intensité de la douleur chronique chez le chien

| Échelle | Composition | Fiabilité¹ | Validité¹ | Sensibilité² |
|--|--|--|--|---|
| <i>Helsinki Chronic Pain Index</i> (Hielm-Björkman et al., 2003, 2009a; Watson et al., 2013) | 11 items regroupés en 3 domaines : Mobilité, Émotion, Vocalisation | Test-retest : CCI = 0,84 à 0,92 Cronbach α : 0,82 Corrélation inter-item, $r = 0,31$ | <u>Validation de construit</u> (analyse en composante principale : $n = 69$ chiens, comparaison de groupes extrêmes : différence entre $n = 17$ chiens placebo et $n = 17$ chiens carprofène) <u>Validation convergente</u> (Corrélation avec QoL : $n = 61$, $r = 0,72$; Corrélation avec une échelle de mobilité : $n = 61$, $r = 0,67$; Corrélation avec PVF : $n = 220$, $r = 0,12^{ns}$) | CTL > carprofène CTL > moule verte CTL = homéopathie (Hielm-Björkman et al., 2009b, 2009c) |
| <i>Canine Brief Pain Inventory</i> (Brown et al., 2007, 2008) | 10 items regroupés en 2 domaines : Sévérité de la douleur (4 items), Interférence avec la fonction (6 items) | Test-retest : Kappa = 0,75 à 0,81 Cronbach α : 0,92 Corrélation inter-item : $r = 0,71$ et 0,65 | <u>Validation de construit</u> (analyse factorielle et comparaison de groupes extrêmes : $n = 70$ chiens, différence entre un groupe placebo et un groupe traité au carprofène) <u>Validation de convergence</u> (Corrélation avec QoL : $n = 70$ chiens, $r = 0,50$; Pas de corrélation avec PVF : $n = 78$ chiens, $r < 0,40^{ns}$; Corrélation avec PFV : $n = 220$ chiens, $r = 0,23$) | CTL > carprofène (Brown et al., 2008) CTL = anti-oxydant S-adenosyl méthionine (Imhoff et al., 2011) |

| | | | | |
|--|---|---|--|---|
| <p>Liverpool Osteoarthritis in Dogs (Hercock et al., 2009; Walton et al., 2013)</p> | <p>L'échelle de douleur associée à l'arthrose du coude est composée de 14 items</p> | <p>Test-retest: CCI = 0,75 à 0,95 Cronbach α : 0,88</p> | <p><u>Validité de construit</u> (analyse factorielle (3 domaines) chez des chiens arthrosiques par comparaison à des chien sains) <u>Validité de convergence</u> (corrélation avec PFV : n = 222, r = 0.23; corrélation entre les échelles de douleur chronique CBPI et HCPI : n = 222, r < 0,4)</p> | <p>CTL = carprofène (Hercock et al., 2009)</p> |
| <p>Client Specific Outcome Measure (Gingerich and Strobel, 2003)</p> | <p>5 activités déterminées par le propriétaire</p> | <p>–</p> | <p>Non applicable</p> | <p>CTL > amantadine + AINS (Lascelles et al., 2008) CTL > lait hyper-immun (Gingerich and Strobel, 2003)</p> |

¹ Stratégies de fiabilité et de validité dans le cadre du développement et de la validation de l'utilisation des échelles d'intensité de douleur chronique chez les chiens atteints d'arthrose. ² Résultats d'études d'utilisation des échelles suivant la comparaison de différents groupes de traitements lors d'études unicentriques, dont les population se composent de chiens atteints d'arthrose naturelle. CCI : Coefficient de corrélation intra-classe; r : Coefficient de corrélation de Spearman; PFV : Pic de la force verticale; QoL : sigle anglais pour la qualité de vie (*Quality of life*); CTL : groupe contrôle avec administration de substance placebo; ^{ns} Non significatif; > : score supérieur à; = : score identique à.

2.2.3 L'évaluation comportementale

La douleur modifie le comportement naturel de l'animal. Ainsi, la douleur est quantifiée selon les changements des comportements habituels. La diminution des comportements normaux et habituels concernent, par exemple, les comportements alimentaires, les soins corporels, l'activité motrice, la locomotion et le comportement social (Wiseman et al., 2001; Mogil et al., 2010). La mesure des comportements inhabituels est également utilisée pour quantifier la douleur. Des méthodes de mesures objectives permettent de qualifier et de quantifier le changement de comportement d'un animal en douleur. Les mesures des comportements par l'observation directe et à l'aide d'enregistrements automatisés chez le chien (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000; Hansen et al., 2007) et le bovin (Siivonen et al., 2011; Fogsgaard et al., 2012) sont des méthodes usuelles de mesure de la douleur. Chez les bovins, l'étude de comportement par bio-télémetrie (White et al., 2008; Theurer et al., 2012) permet surtout de suivre l'activité motrice des bovins.

L'évaluation du comportement s'effectue par observation directe et par observation à l'aide de la vidéo-analyse. L'observation directe et la vidéo-analyse diffèrent en de nombreux points (Tableau VII). La vidéo-analyse offre la possibilité d'augmenter le champ d'observation dans le temps, sur une mesure continue, sans interaction avec l'animal en douleur, et de contrôler les erreurs de mesures (Tableau VII). Les mesures de fiabilité sont communes entre l'observation directe et la vidéo-analyse mais, grâce à la vidéo-analyse, les mesures de la fiabilité intra-observateur (consistance et cohérence de la mesure au cours du temps) sont des tests possibles en temps

différé sur des vidéo identiques. Évaluer de nouveau un même échantillonnage permet de mettre en évidence les risques d'erreurs de mesure et de manque de fiabilité du codeur au cours du temps. Dès lors, l'un des défis de l'observation directe par rapport à la vidéo-analyse serait de contrôler fréquemment la fiabilité intra-observateur et de proposer des sessions régulières de formation (Haidet et al., 2009).

Une formation standardisée permet d'achever des critères acceptables de fiabilité. La formation comprend une connaissance des comportements étudiés et de leurs définitions ainsi qu'une analyse des interprétations possibles des comportements (Jourdan et al., 2001; Haidet et al., 2009). Selon Haidet et al., (2009), la formation permet de réduire la variabilité dans l'interprétation des codes. La durée de la formation semble variable en fonction de la complexité du programme de formation qui consiste à s'approprier le manuel de pratique (code et définitions des comportements), harmoniser les observations entre les évaluateurs dans le but d'obtenir un accord de 70 à 80% (Haidet et al., 2009). Le protocole de formation des codeurs n'a pas été cité dans les études de comportements chez le chien (Kyles et al., 1998; Firth and Haldane, 1999; Fox et al., 2000).

La fiabilité de la mesure est un critère déterminant de l'analyse comportementale. Les stratégies de mesure de la fiabilité entre les évaluateurs se compose des tests de concordance (coefficient Kappa, coefficient de corrélation intra-classe...) sur 10 % des évaluations pour définir la concordance entre les évaluateurs (Martin and Bateson, 2007). Les tests de fiabilité intra-observateur, réalisables grâce la vidéo-analyse, sont nécessaires au moins au début et en fin d'étude pour vérifier que le codeur est concordant au cours du temps (Martin and Bateson, 2007; Haidet et al., 2009).

Tableau VII - Caractéristiques et différences entre l'observation directe et l'observation par vidéo-analyse

| | Observation directe | Vidéo-analyse | Défis de l'observation directe face à la vidéo-analyse |
|----------------------------|---|--|---|
| Instrument | Codage manuel en temps réel | Système de codage automatisé en temps différé | Possibilité d'erreur de saisie qui ne peut être vérifiée en revenant sur la session d'observation; Possibilité de pertes d'informations; |
| Durée de la mesure | Limitée par l'évaluateur | Limitée mais le temps d'analyse sur une longue période d'enregistrement peut être fractionné | De longues périodes d'observation directe augmentent le risque de perdre l'attention de l'évaluateur (en raison de la fatigue par exemple) |
| Fréquence de mesure | Évaluation ponctuelle ou séquencée | Évaluation ponctuelle, séquencée ou continue | Perte d'information en ne permettant pas d'observer à tout moment (comme par exemple suivre le cycle circadien d'un comportement chez l'animal) |
| Période de mesure | Dépend de la disponibilité de l'observateur | Pas de restriction | Perte d'information possible en raison du manque de disponibilité |
| Lieu de la | Sur le lieu de l'étude; Le champ d'observation est | En laboratoire; Le champ d'observation est | L'observateur est obligatoirement au contact de l'animal, il ne peut être naïf et peut être influencé par les conditions de |

| | | | |
|------------------------------------|--|---|--|
| mesure | ouvert avec possibilité d'interagir | fermé sans interaction avec l'observateur | l'étude. Le comportement normal de l'animal peut être modifié en présence de l'observateur (défense ou fuite par exemple) |
| Temps de mesure | Les sessions d'observation suivent l'évolution au cours du temps | Les sessions d'observation peuvent être indépendantes de l'évolution temporelle | La mesure est dépendante de l'observation précédente et un possible biais de mesure. |
| Formation | Sur la base d'échantillons différents | Possible sur la base d'échantillons identiques | Ne permet pas de revenir sur des échantillons qui servent de référence pour suivre la courbe d'apprentissage |
| Fiabilité de la mesure | Fiabilité intra-observateurs calculée sur des échantillons différents ou des outils différents | Fiabilité intra-observateur calculée sur des échantillons identiques | Ne permet pas de revenir en arrière pour vérifier la fiabilité intra-observateur sur la base d'échantillons identiques |
| Fiabilité inter-observateur | Coefficient de corrélation intraclass; Kappa; Coefficient de corrélation | Coefficient de corrélation intraclass; Kappa; Coefficient de corrélation | Ne permet pas de revenir sur l'évaluation pour identifier et analyser collectivement les sources d'erreur, de biais sur la base d'échantillons identiques L'observation directe réalisée par plusieurs observateurs en même temps peut être source d'influence entre les observateurs |

La validité des changements de comportements est basée sur la comparaison d'animaux en douleur ayant reçu un analgésique pour soulager la douleur *versus* un placebo (Roughan and Flecknell, 2000; Roughan and Flecknell, 2001; Roughan and Flecknell, 2004). En comparant un panel de 150 comportements chez des rongeurs ayant une douleur viscérale induite et recevant soit une administration de buprénorphine, du carprofène ou un placebo, seuls 17 comportements sont liés à la douleur (Roughan and Flecknell, 2004). Plus spécifiquement, l'analyse discriminante a permis de regrouper des comportements spécifiques en fonction de chaque groupe de traitement (Roughan and Flecknell, 2004). La comparaison de groupes avec et sans analgésique permet effectivement d'identifier les signes comportementaux associés à de la douleur et suggère également qu'un seul critère à lui seul ne peut différencier les sévérités de douleur chez le rongeur (Roughan and Flecknell, 2000; Roughan and Flecknell, 2001; Roughan and Flecknell, 2004), le bovin (Molony and Kent, 1997; McMeekan et al., 1999; Sylvester et al., 2004) et le chien (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000). L'analyse des composantes principales des occurrences de comportements chez des chiennes en douleur postopératoire (Fox et al., 2000) et d'analyse factorielle sont des stratégies utilisées pour étudier la validité du contenu, de convergence et discriminante des listes de comportements (Fox et al., 2000) et d'échelles comportementales (Firth and Haldane, 1999) chez le chien. La validité discriminante est également testée en évaluant l'effet sédatif du butorphanol chez des chiennes suivant une chirurgie d'ovariohystérectomie par comparaison à des chiennes non opérées mais ayant reçu du butorphanol (Fox et al., 2000). Ces évaluations ont montré que l'effet sédatif du butorphanol est un facteur confondant de la mesure de la douleur (Firth and Haldane, 1999; Roughan and Flecknell, 2004).

Chez les rongeurs, la douleur déclenche des mimiques faciales (Langford et al., 2010) et des postures anormales (Roughan and Flecknell, 2001). L'étude des comportements chez les rongeurs démontre des différences d'expression de comportement de la douleur en fonction de l'origine de la douleur. Un modèle de laparotomie avec manipulation douce de la vessie chez le rongeur modifie, par exemple, la vocalisation et le toilettage (Roughan and Flecknell, 2000). Des troubles de l'activité locomotrice et de la démarche (mesures spatiales et temporelles des cycles de marche, pression de patte au sol, étendue des mouvements articulaires) sont corrélés à la douleur chez les rongeurs après l'induction d'un modèle de douleur articulaire (Fernihough et al., 2004; Bove et al., 2006; Piesla et al., 2009). En comparant les études de douleur pour une même espèce (ici le rongeur a été pris en exemple), on observe une certaine différence d'expression de douleur en fonction des causes de la douleur et un manque de stéréotypie de la douleur pour cette même espèce. Cela suggère une étude spécifique du comportement en fonction du modèle de douleur et de l'espèce.

L'évaluation du comportement s'effectue par observation directe et par observation à l'aide de la vidéo-analyse. Les stratégies de fiabilité et de validité sont cohérentes avec les stratégies développées pour les échelles multidimensionnelles. La fiabilité intra-observateur est possible lors de vidéo-analyse pour tester la cohérence de l'évaluateur au cours du temps. Des stratégies de fiabilité et de validités ont été réalisées chez le chien. Ces études ont suggéré que des traitements analgésiques, comme les morphiniques, peuvent être des facteurs confondants à la mesure de la douleur. L'expérience chez les rongeurs démontre que les changements de comportements sont dépendants des modèles de douleur, seuls quelques comportements sont sensibles et spécifiques de la douleur.

2.2.4 La mesure des réponses physiologiques et endocriniennes associées au stress

Le stress et la douleur sont deux concepts différents néanmoins la douleur peut induire un état de stress dont les manifestations sont cliniquement et biologiquement mesurables. En effet, une décharge nociceptive est un évènement stressant qui stimule entre autre l'hypothalamus, puis conduit à l'activation du SNA sympathique. Il en résulte une libération de somatostatine, de neuropeptide Y et de catécholamines par les glandes médullosurrénales (adrénaline surtout et noradrénaline). Les catécholamines sont des messagers hormonaux responsables des effets stimulants cardiovasculaires associés au stress. Également, les catécholamines hydrosolubles activent le tractus solitaire *via* le nerf vague puis activent le *locus caeruleus* et ce, conjointement à la stimulation directe du *locus caeruleus* par l'hypothalamus. Ces voies neuronales permettent l'activation des neurones noradrénergiques et des récepteurs α 2-adrénergiques, situés au niveau des régions cérébrales préfrontales et limbiques, elles-mêmes impliquées dans la douleur et les modulations cardiovasculaires (Bruehl and Chung, 2004). Lorsque le stress persiste, l'hypothalamus stimule l'hypophyse *via* la corticolibérine (CRH), puis l'hypophyse libère l'hormone adrénocorticotrophine (ACTH) à l'origine, entre autres, de la sécrétion de cortisol plasmatique. D'un point de vue clinique, les changements physiologiques sont l'accélération du rythme cardiaque, l'élévation de la pression artérielle, la respiration plus rapide et la libération d'hormones (ACTH, cortisol, adrénaline, noradrénaline, ocytocine, vasopressine). Ces changements peuvent être des indicateurs de la douleur car ils reflètent les mécanismes nerveux et hormonaux associés à la douleur et au stress (Blackburn Munro, 2004; Bomholt et al., 2004).

L'activité du système nerveux végétatif sympathique a été également étudiée à l'aide d'autres méthodes telles que la thermographie infrarouge (Stewart et al., 2007), la mesure de la variabilité cardiaque (Stewart et al., 2010) et la mesure des courants cutanés sympathiques. Par exemple, l'activité électrodermique (AED) exprime les potentiels cutanés sympathiques qui sont liés à une variation de résistance des tissus cutanés. Les potentiels cutanés sont induits par la stimulation des glandes sudoripares *via* l'activation des fibres non myélinisées de type C des nerfs sympathiques efférents (Critchley, 2002). La mesure continue de l'AED est corrélée à la douleur postopératoire (Storm et al., 2005; Ledowski et al., 2006) et à la stimulation nociceptive chez les patients humains (Storm, 2000). Cette variable est modulée par l'administration de morphine chez le chat (Traore et al., 1998) et est corrélée aux changements de catécholamines plasmatiques lors de douleur postopératoire (Storm et al., 2002). Ces résultats mettent en relation la régulation de la douleur à l'activité du SNA.

Nous avons vu principalement que le stress et la douleur sont associés à l'activité de l'axe hypothalamo-adréno-hypophysaire. Ce mécanisme est présent lors de douleur aiguë et chronique (Blackburn-Munro and Blackburn-Munro, 2001). Récemment, il a été mis en évidence que la sécrétion de CRH serait liée à l'activité du système limbique lors de douleur neuropathique (Rouwette et al., 2012). Ainsi la douleur et le stress chronique activeraient des voies différentes de la classique voie d'activation de l'axe hypothalamo-adréno-hypophysaire, ce qui ouvre de nouvelles opportunités de mesure de la douleur.

2.2.5 Synthèse

En résumé, les méthodes usuelles de mesure de la douleur sont variées eu égard d'une définition de la douleur peu restrictive et des mécanismes physiopathologiques complexes et dynamiques. En médecine vétérinaire, l'algésimétrie et les échelles d'intensité de douleur sont les méthodes répandues car ces méthodes sont considérées comme des mesures directes de la douleur. L'étude des changements du comportement est parcimonieuse et partiellement décrite chez nos espèces canines et bovines. Toutefois, cette méthode serait riche d'enseignement car elle mesure la partie visible de la douleur exprimée. Finalement, les liens physiologiques entre la douleur et la réponse de stress peuvent expliquer l'utilisation de la mesure des paramètres cliniques (fréquences cardiaque, respiratoire, ...) et biologiques (cortisolémie, ...) associés au stress.

2.3 L'évaluation de la douleur sur des modèles bovins et canins de douleur

La définition de la douleur est unique pour les animaux ce qui permet de choisir des instruments communs pour la mesure de la douleur. Ce sont les différentes stratégies de fiabilité et la validité développées par les théories psychométriques qui supportent l'utilisation des méthodes de mesure de la douleur. Nous allons présenter les résultats de la fiabilité et la validité de l'utilisation des méthodes usuelles précédemment décrites chez les bovins et les chiens. La synthèse est basée sur des études pertinentes de la douleur chez le bovin (études en lien avec l'étude de recherche à la Maîtrise) et des études portant sur la douleur postopératoire et la douleur associée à l'arthrose chez le

chien (études en lien avec les études de recherche au Doctorat). La synthèse aura pour objectif de définir une problématique et un axe de recherche communs dans le processus de validation des méthodes de mesure de la douleur, quels que soient l'espèce et le modèle de douleur.

2.3.1 La douleur chez les bovins

2.3.1.1 L'épidémiologie et les modèles de douleur en espèce bovine

Tout comme les autres espèces animales, la douleur touche les bovins. La douleur bovine n'est pas à proprement parler un modèle expérimental de douleur animale mais son intérêt est lié à la recherche d'une bonne productivité qui est diminuée quand l'animal est malade ou en état de stress. Des études épidémiologiques ont révélé que la douleur était jugée importante suivant certaines pathologies inflammatoires, lors de la régie des animaux et enfin, lors de chirurgies notamment celles d'origine abdominale (Huxley and Whay, 2006; Laven et al., 2009).

De très rares modèles expérimentaux, tels que l'inflammation de la pulpe dentaire chez les bovin(Hargreaves et al., 2003), des modèles de boiterie chez les bovins et de douleur viscérale en réalisant une distension duodénale chez les ovins (Nolan et al., 1987; Ley et al., 1991; Kania et al., 2006) ont été créés pour étudier la douleur ou tester l'efficacité d'agents analgésiques des ruminants. À ce jour, la persistance des modèles bovins de douleur a pour objectif de répondre à des questions uniques à l'espèce, à savoir, l'impact de la douleur sur les performances économiques et le bien-être de ces animaux de production. Chez le veau, la douleur est étudiée lors d'opérations de régie, telles que la castration, l'écornage et la coupe de queue (Molony et al., 1995; Molony and Kent, 1997). Chez la vache, la douleur est

étudiée lors de boiteries (Schulz et al., 2011) et de mammites aigües (Rasmussen et al., 2011; Siivonen et al., 2011; Fogsgaard et al., 2012), deux conditions pathologiques fréquentes en élevage.

2.3.1.2 Les stratégies de validation des méthodes de mesures de la douleur bovine

2.3.1.2.1 Les mesures neurophysiologiques associées à la douleur

L'algésimétrie est une méthode courante pour la mesure de la douleur chez les bovins. L'application croissante de stimulations nociceptives électriques, thermiques ou mécaniques au niveau des membres des bovins (Machado Filho et al., 1998; Veissier et al., 2000; Herskin et al., 2003a) augmente les réponses comportementales (principalement le coup de pied) de façon croissante et reproductible, ce qui supporte la fiabilité et la validité de l'utilisation de l'algésimétrie.

Des bovins avec une pathologie inflammatoire comparés à des bovins sans pathologie inflammatoire ont permis d'étudier la validité de construit. La sensibilisation, mesurée à l'aide d'un filament de von Frey ou par compression mécanique, augmente en périphérie du bourgeon de la corne qui est brûlée chez le veau écorné (Heinrich et al., 2010; Mintline et al., 2013). La sensibilisation augmente de façon transitoire chez les vaches présentant une mammite aigüe d'origine infectieuse (Fitzpatrick et al., 2013). Sur des vaches présentant une boiterie chronique d'origine inflammatoire, la sensibilité mécanique augmente de façon significative lorsque le test est appliqué au niveau de la patte boiteuse (Whay et al., 1997; Whay et al., 1998; Tadich et al., 2013). Également, la sensibilité diminue après guérison de la patte boiteuse (Whay et al., 1998). Ces résultats suggèrent que les bovins

présentent de la sensibilisation. L'utilisation de l'algésimètre semble valide pour la mesure de la douleur chirurgicale et lors de pathologie aigüe.

À l'inverse, certains auteurs ont également montré des sensibilités nociceptives similaires entre des bovins ayant une boiterie clinique et ceux ne présentant pas de boiterie clinique (Whay et al., 2005). Une absence d'effet anti-hyperalgésique des AINS (kétoprofène) est observée chez des bovins affectés d'une boiterie chronique (Whay et al., 2005; Laven et al., 2008). De plus, d'autres travaux ont quantifié de l'hyposensibilité lorsque le test est appliqué au niveau des pattes situées controlatéralement à des mammites inflammatoires induites expérimentalement (Kemp et al., 2008; Rasmussen et al., 2011). La faible sensibilisation ou l'hyposensibilité suggérerait que la méthode ne serait pas valide pour mesurer le contrôle médullaire et central de la douleur chez les bovins en présence de douleur inflammatoire prolongée telle que la boiterie. On peut émettre différentes hypothèses pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, en l'absence de mesures de fiabilité, on peut émettre l'hypothèse d'erreurs de mesure pour les études citées précédemment (Kemp et al., 2008; Laven et al., 2009; Rasmussen et al., 2011). Ensuite, le stress serait un facteur confondant puisqu'il a été démontré que les vaches sont hyposensibles ou hyporéflexives lors de stress imposé en l'absence de douleur (Rushen et al., 1999; Herskin et al., 2004). On pourrait supposer que l'apprentissage ou la mémorisation de la procédure de mesure influe sur le résultat, or la répétition des stimulations nociceptives ne modifie pas les seuils de sensibilité en condition non douloureuse (Herskin et al., 2003a; Vickers et al., 2005). Ceci suggère l'absence de mémorisation sur la réponse nociceptive. L'hyposensibilité pourrait être également causée par le refus des animaux à bouger pour limiter la douleur ou l'inconfort (Ting et al., 2010). Finalement, il a été démontré qu'après administration d'AINS, une réponse

réflexe d'intolérance à la stimulation nociceptive s'effectue sur des stimulations de fortes intensités (Bustamante et al., 1996) mais les AINS, à l'inverse de la morphine, ne diminuent pas les seuils de sensibilité (Guirimand et al., 1995). En synthèse, la validité de l'utilisation de tests nociceptifs pour mesurer la présence de sensibilisation semble démontrée. Cependant, le stress ou des procédures de mesure (à l'origine d'erreurs de mesure) sont un risque d'hyposensibilité ou de non réponse au test. Il serait nécessaire de prendre en compte les facteurs, comme le stress, qui pourraient favoriser l'apparition d'hyposensibilité lors de futures études chez les bovins.

L'intérêt pour les bio-marqueurs de la douleur en médecine bovine est récent. En effet, le dosage de la concentration plasmatique de la substance P est une mesure plus sensible que celui de la concentration du cortisol plasmatique chez des bovins castrés (Coetzee et al., 2008). Également, la CGRP est augmentée dans des cultures cellulaires de pulpes dentaires d'origine bovine après l'induction d'inflammation par un agent algogène (Hargreaves et al., 2003). Ces neuropeptides, substance P et CGRP, n'ont pas été mesurés au niveau du système nerveux central chez les bovins. Il est donc difficile d'anticiper la validité de ces bio-marqueurs systémiques et de relier la présence de ces bio-marqueurs systémiques à la réponse nociceptive d'origine centrale chez le bovin.

L'activité neuronale a été investiguée à l'aide d'EEG chez des veaux castrés (Bergamasco et al., 2011). Cette étude de validation de l'EEG, comme une mesure possible de la douleur, a démontré que les veaux castrés et traités avec de l'aspirine présentaient des réponses électroencéphalographiques semblables aux veaux non traités, ce qui ne permet pas de conclure quant à la validité de la mesure d'EEG pour mesurer la douleur (Bergamasco et al., 2011). Également, des veaux écornés avaient une réponse EEG modifiée mais

il n'y avait pas de différence entre les veaux écornés avec un placebo de ceux traités avec une anesthésie locale (Gibson et al., 2007). Également, chez le veau castré, l'augmentation de l'activité électroencéphalographique est corrélée à la réponse de stress (Bergamasco et al., 2011). D'autres investigations seraient nécessaires pour établir la validité de la mesure de l'activité neuronale chez les bovins pour l'évaluation de la douleur.

2.3.1.2.2 Les mesures comportementales

Les bovins ont un comportement de nature stoïque. En raison de ce comportement, il a été jugé qu'il était fort improbable que les bovins expriment de la douleur (Short, 1998). Les stratégies de validation basées sur une mesure de la différence de comportements de bovins en douleur après l'administration d'analgésique a permis de définir les qualités métriques de l'observation directe et de la vidéo-analyse. Les anomalies de posture chez le veau castré et une augmentation des mouvements de la tête et des oreilles du veau écorné (Molony et al., 1995; Thuer et al., 2007), le piétinement des pattes arrières de la vache en mammite (Chapinal et al., 2013), la diminution du comportement de jeu chez le veau écorné (Mintline et al., 2013) seraient des comportements spécifiques associés à de la douleur aiguë. Ces comportements augmentaient avec la douleur et diminuaient en présence d'anesthésiques locaux, d'AINS et de xylazine (Graf and Senn, 1999; Grondahl-Nielsen et al., 1999; McMeekan et al., 1999; Doherty et al., 2007). À l'inverse, une diminution de l'activité (Ting et al., 2003; Thuer et al., 2007), une diminution de l'alimentation et de la rumination (McMeekan et al., 1999; Sylvester et al., 2004; Stafford and Mellor, 2005; Siivonen et al., 2011; Fogsgaard et al., 2012), une modification du comportement de fuite (Lay et al., 1992) présentent des résultats inconstants pour mesurer la douleur. Les comportements lors de douleur aiguë cités ci-dessus semblent bien décrits

mais les comportements lors de douleur chronique ne sont pas aussi bien définis. Une diminution de l'activité normale et des anomalies de la posture seraient évocateurs de douleur chronique (Molony et al., 1995).

Les comportements indicateurs de douleur ne sont pas systématiquement transposables d'un modèle de douleur à un autre. En effet, il n'a pas été possible de différencier des vaches traitées avec une anesthésie locale de celles traitées sans anesthésie locale lors de ruminocentèse sur la base de la mesure de la fréquence des mouvements des oreilles et la fréquence des positions de la tête (Mialon et al., 2012). Toutefois, la validité de l'utilisation de ces deux comportements, l'augmentation du mouvement des oreilles et de la position de la tête, a été démontrée chez des veaux écornés par comparaison à des veaux non écornés dont le bourgeon de corne reçoit une stimulation nociceptive (Molony et al., 1995; Thuer et al., 2007). Cela suggère que la validité des mesures des changements de comportements, observables par mesure directe ou par vidéo-analyse sont reliés au modèle de douleur.

Malgré une liste non exhaustive de comportements, étudiés par observation directe ou vidéo-analyse, et associés à la douleur chez les bovins, il n'y pas eu de développement et de validation d'échelle de comportements de douleur pour cette espèce à ce jour. Les comportements listés plus hauts sont souvent cités pour évaluer la douleur sans établir pour autant une véritable échelle de douleur (Molony et al., 1995; Mialon et al., 2012).

L'activité, mesurée à l'aide d'accéléromètre a été utilisée pour l'étude de la douleur dans des conditions postopératoires (White et al., 2008; Currah et al., 2009). Il est démontré que les bovins sont moins actifs suivant une castration (White et al., 2008). Selon ces études, la douleur diminuerait l'activité chez les bovins. En plus de mesurer l'activité, les accéléromètres

ont été utilisés pour mesurer les changements de position des bovins. Les accéléromètres positionnés au niveau des pattes ont démontré que les veaux castrés passent plus de temps debout et piétinent peu (White et al., 2008) alors que des veaux boiteux passent plus de temps couché (Schulz et al., 2011) par comparaison à des veaux en absence de douleur. Des vaches ayant eu une chirurgie par le flanc passaient plus de temps couchées que des vaches ayant une laparotomie réalisée par voie paramédiane (Newby et al., 2013). La baisse de l'activité serait un indicateur associé à de la douleur et semble également corrélée à une posture ou une position de soulagement de l'animal.

En résumé, la stratégie de validation repose sur la capacité à différencier des changements de comportements. La validité repose sur une analyse séparée de chaque comportement identifié comme étant un indicateur de la douleur.

2.3.1.2.3 Les mesures physiologiques et endocriniennes associées au stress

La mesure de l'activité sympathique comme indicateur de douleur est extrêmement courante chez les bovins (Petrie et al., 1996; Mellor and Stafford, 1997; Stafford et al., 2003). Les concentrations plasmatiques de la noradrénaline et de l'adrénaline augmentent en présence de douleur (Mellor et al., 2002) mais la demi-vie de ces catécholamines est trop courte pour évaluer la douleur sur une longue période. Des méthodes indirectes de mesure de l'activité sympathique, comme par exemple, la thermographie oculaire (Stewart et al., 2007), la mesure de la variabilité cardiaque (Stewart et al., 2008; Stewart et al., 2010), sont des méthodes non invasives et seraient sensibles aux anesthésiques locaux lors de douleur aiguë du bovin. En revanche, la mesure de l'AED s'est révélée non sensible à la douleur chirurgicale et serait influencée par l'activité sédatrice ou à l'action agoniste

de la xylazine sur le récepteur alpha-2-adrénérique chez les bovins (Baldrige et al., 2011).

La mesure du cortisol plasmatique a été longtemps une mesure de référence de la douleur aiguë chez les bovins (Stafford and Mellor, 2005). En effet, la cortisolémie plasmatique augmentait lors de castration ou d'écornage et diminuait avec lorsque les veaux castrés et écornés étaient traités avec des AINS. Des études récentes ont démontré que les concentrations plasmatiques et salivaires de cortisol augmentaient suivant l'administration de xylazine (Stilwell et al., 2010) et ne différenciaient pas des bovins non traités de ceux traités par de l'aspirine (Bergamasco et al., 2011) et traités avec une anesthésie locale (Mialon et al., 2012). Également, l'hypercortisolémie plasmatique n'était pas corrélée au changements de comportements (mouvement des oreilles et de la tête) du veau écorné (Stilwell et al., 2010). La cortisolémie est corrélée à l'augmentation de la sensibilité thermique chez des vaches que l'on place en condition de stress (changement d'environnement) (Rushen et al., 1999; Herskin et al., 2003b; Herskin et al., 2004; Herskin et al., 2007). Le cortisol est une mesure de stress mais les études de validation de construit invalident la mesure de la cortisolémie plasmatique comme indicateur de douleur.

En résumé, les mesures physiologiques et de la cortisolémie (indicateurs de l'activité sympathique et de l'activité endocrinienne) qui sont des mesures de stress, peuvent être associées à la douleur. Des stratégies de validation discriminante, basées à la fois sur une évaluation du stress et de la douleur, devraient mieux distinguer les mesures sensibles au stress de celles indicatrices de la douleur.

2.3.1.3 Synthèse sur les méthodes de mesure de la douleur chez le bovin

Les stratégies de validation des méthodes de mesure de la douleur chez les bovins reposent essentiellement sur l'étude de la douleur chez les jeunes (lors de castration et d'écornage) ayant reçu un analgésique par comparaison à ceux traités avec un placebo. Ces procédures ont conduit historiquement à utiliser des mesures, telles que la cortisolémie plasmatique, comme des références de la douleur bovine.

Les études récentes chez la vache, par exemple lors de mammites aiguës et infectieuses (Rasmussen et al., 2011; Siivonen et al., 2011; Fogsgaard et al., 2012), suivant une douleur chirurgicale (Mialon et al., 2012) relancent l'intérêt de la mesure de la douleur chez le bovin en diversifiant les méthodes (par exemple, des mesures comportementales automatisées), en mesurant différentes conditions de douleur et en diversifiant les stratégies de validation de la mesure. De ces études, la cortisolémie ne semble pas un indicateur de la douleur (résultat d'étude de validation convergente). La sensibilisation serait un indicateur de la douleur mais certaines précautions seraient à prendre pour identifier les facteurs à l'origine de l'hyposensibilité et tester la fiabilité des mesures de la sensibilisation.

Peu de méthodes ont été testées pour l'étude de la mesure de la douleur chez le bovin. Les bio-marqueurs cérébrospinaux, comme indicateurs de la modulation centrale de la douleur, n'ont pas été investigués. Les principes de développement et de validation des échelles de douleur n'ont pas été appliqués en médecine bovine. Finalement, il n'y a pas de validité de l'utilisation de méthodes de mesure de la douleur chronique chez les bovins.

2.3.2 La douleur d'origine articulaire chez le chien

Cette partie traite de la validation de l'évaluation de la douleur lorsque son origine est orthopédique. Nous allons décrire les mécanismes connus de la douleur lorsque la douleur est générée au niveau d'un membre porteur. La validation des méthodes de mesure de la douleur orthopédique chez le chien sera présentée pour deux conditions de douleur, l'une postopératoire et l'autre lorsque la douleur est liée à l'arthrose.

2.3.2.1 Les mécanismes et les spécificités de la douleur articulaire

L'articulation se compose de plusieurs tissus incluant des ligaments, une capsule fibreuse, du tissu adipeux, des ménisques, le périoste et l'os sous-chondral, la membrane synoviale et le cartilage (McDougall, 2006; Schaible et al., 2009). L'ensemble de ces tissus, à l'exception du cartilage, est innervé par des fibres nociceptives et sympathiques à l'origine de la perception de la douleur (Mach et al., 2002). Les causes de la douleur articulaire sont variées. L'inflammation est une cause principale de douleur articulaire. Expérimentalement, l'inflammation articulaire est induite par l'injection intra-articulaire de substances irritantes, tels que, par exemple, les cristaux d'urates chez le chien (Hazewinkel et al., 2008). L'inflammation articulaire provoque une hyperalgésie mécanique expliquée par la relâche des médiateurs de l'inflammation et de neuromédiateurs (bradykinine, prostaglandine E₂, prostaglandine I₂, sérotonine, substance P, galanine, neuropeptide Y, nociceptine, ...). Ces acteurs augmentent de façon prolongée l'excitabilité neuronale des fibres polymodales C et A δ alors que l'excitabilité neuronale des fibres A β est fugace (McDougall, 2006; Schaible et al., 2009). Des fibres de type C, dites silencieuses et normalement non sensibles aux *stimuli* nociceptifs, sont également sensibilisées suivant l'inflammation

(Schmidt et al., 1995). Lors de persistance de douleur, les fibres A β habituellement non nociceptives présentent des décharges ectopiques nociceptives (Devor, 2009). La sensibilisation au niveau de l'articulation est expliquée à la fois par une activation des nocicepteurs (par exemple, les canaux ionotropiques activés par des molécules de la famille des vanilloïdes comme le TRPV1 (sigle anglais pour *transient receptor potential vanilloid 1*) et les canaux ioniques dits ASIC (sigle anglais pour *acid-sensing ion channel*) et une augmentation de leur sensibilité (*via* des neuropeptides excitateurs, des facteurs de transcription et des facteurs inflammatoires). La sensibilisation est d'origine périphérique, rétrograde et centrale. Parmi les nombreux neuropeptides, la CGRP et la substance P sont relâchées dans la corne dorsale de la moelle épinière chez des modèles rongeurs de douleur articulaire d'origine inflammatoire (Schaible et al., 1990; Staton et al., 2007). Ces neuropeptides sont des acteurs importants dans la sensibilisation articulaire. Dès lors, sous l'influence de différents agents inflammatoires immunitaires et neurogéniques, le phénomène de *wind-up* (voir section 2.2.1.1), la potentialisation à long terme qui est une augmentation persistante de la réponse synaptique, une augmentation des mécanismes excitateurs conjuguée à une diminution des mécanismes inhibiteurs de la douleur, la contribution des nerfs, des cellules gliales et des cellules inflammatoires dans la genèse et le maintien de l'inflammation neurogénique, ainsi que la participation des fibres sympathiques, tous ensemble, sont des acteurs de la sensibilisation secondaire (McDougall, 2006; Sandkühler, 2007; Basbaum et al., 2009; Cervero, 2009).

En périphérie de l'articulation, la peau et les muscles sont eux aussi dotés d'un système nociceptif. L'information douloureuse initiale située au niveau de l'articulation est transmise au niveau de la corne dorsale de la

moelle épinière. Le champ de perception de la douleur articulaire peut être augmenté en raison de la convergence entre les fibres afférentes d'origine articulaire et celles provenant de la peau et des muscles (Schaible et al., 2009; Sengupta, 2009). Ainsi, il a été démontré que la peau participe à la douleur chronique sur un modèle rongeur d'arthrose (Thakur et al., 2012). Cette convergence augmente la difficulté à discerner les origines de la douleur. En effet, des travaux récents ont démontré des spécificités des tissus vis-à-vis des mécanismes de la douleur. Chez le rongeur, la peau, innervée par des fibres peptidergiques (fibres contenant la substance P et la CGRP par exemple), des fibres non peptidergiques (fibres contenant l'isolectine B4) (Jimenez-Andrade et al., 2010) présente une sensibilité plutôt de type thermique lorsqu'il y a une inflammation. Le tissu articulaire se compose de fibres de type essentiellement peptidergiques (Mach et al., 2002; Jimenez-Andrade et al., 2010) et la sensibilisation est mécanique suivant une inflammation (Schaible et al., 2009). Cela suggère que les différentes origines nociceptives de la douleur devraient être prises en compte dans les évaluations de la douleur.

L'articulation est un organe complexe. Les particularités anatomiques, biomécaniques et nociceptives de l'articulation sont à prendre en compte lors de l'évaluation de la douleur. Une présentation distincte de la validation des méthodes de mesure de la douleur en fonction des deux conditions de douleur, une condition aiguë et une condition chronique, permettra de vérifier si les méthodes de mesure usuelles présentent les mêmes caractéristiques métrologiques.

2.3.2.2 L'évaluation de la douleur articulaire postopératoire

2.3.2.2.1 Les modèles de douleur aigüe d'origine orthopédique

Le modèle d'inflammation de la synovie articulaire par injection intra-articulaire de cristaux d'urates est un modèle d'inflammation aigüe utilisé pour l'étude de la douleur articulaire chez le chien (Waxman et al., 2008; Feldsien et al., 2010). Des études utilisant ce modèle d'inflammation articulaire aigüe ont démontré une diminution de la douleur articulaire suivant l'administration d'AINS (Borer et al., 2003; Hazewinkel et al., 2008), une moindre efficacité analgésique du butorphanol (Borer et al., 2003) et une absence d'effet analgésique de la kétamine (Hamilton et al., 2005), d'un antagoniste au récepteur de la neurokinine-1 (Punke et al., 2007) et d'un composé ayant une activité antagoniste des récepteurs vanilloïdes (TRPV1) (Cathcart et al., 2011). La boiterie et la douleur seraient induites par l'inflammation plutôt qu'une altération des tissus articulaires et la perte d'appui est résolue dans les 10 heures suivant l'administration intra-articulaire de la solution de cristaux d'urates (Feldsien et al., 2010). Ce modèle est donc avant tout un modèle inflammatoire dont l'effet algique des traitements est évalué par la mesure des troubles de la locomotion et particulièrement l'appui de la patte au sol.

Même si le modèle inflammatoire par administration de cristaux d'urate est répandu chez le chien, il n'est pas exactement le reflet de la réponse inflammatoire et nociceptive induite par une chirurgie. Une incision cutanée au niveau des coussinets de la patte de chien augmente l'allodynie et l'hyperalgésie mécanique (Duque et al., 2004). Sur la base de ce même modèle, des études neurophysiologiques, chez des rongeurs, ont démontré que l'activité neuronale spontanée n'a pas été observée suivant une simple

incision de la peau. En revanche, l'incision de la peau conjuguée à l'incision profonde des tissus musculaires provoquent une sensibilisation des fibres afférentes primaires, une activité spontanée des fibres afférentes nociceptives primaires et une activité spontanée des fibres WDR (sigle anglais pour *wide dynamic range*, c'est-à-dire, des neurones ayant un large spectre de sensibilité nociceptive) au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière à l'origine de douleur et du maintien de la sensibilisation mécanique (Xu and Brennan, 2009; Xu and Brennan, 2010). Ces résultats suggèrent que la validité des méthodes de mesure de la douleur ne serait pas identique entre le modèle de cristaux d'urate chez le chien et la douleur induite par chirurgie. Il est donc nécessaire de valider les méthodes usuelles d'évaluation de la douleur chez le chien dans les conditions d'intérêt, c'est-à-dire la chirurgie.

Les chirurgies communément rencontrées en clinique vétérinaire servent de modèle de référence pour évaluer le traitement de la douleur chirurgicale mais le nombre d'études portant sur la validation des méthodes de mesure de la douleur avec un modèle chirurgical est moins élevé (Firth and Haldane, 1999; Holton et al., 2001). Les chirurgies orthopédiques (Wiese et al., 2005) et l'ovariohystérectomie sont des conditions chirurgicales fréquemment utilisées pour évaluer la douleur postopératoire. Toutefois, la douleur observée par les chiens en douleur orthopédique est considérée supérieure à la douleur observée sur les chiens lors de chirurgies des tissus mous (Morton et al., 2005; Weber et al., 2012). Cela suggère que les modèles de chirurgie orthopédique sont susceptibles d'être à la base des modèles de validation de la douleur de forte intensité. Néanmoins, la proportion des études portant sur la validation des méthodes de mesure de la douleur chirurgicale demeure moins importante (Conzemius et al., 1997; Holton et al., 2001; Horstman et al., 2004) que la proportion d'études portant sur

l'efficacité des analgésiques en utilisant des chirurgies orthopédiques. Cette observation soulève toute l'ambiguïté de la validation des méthodes de mesure de la douleur qui repose sur des réponses analgésiques attendues ou hypothétiques en absence de mesure de référence de la douleur.

Les études cliniques qui évaluent la douleur postopératoire en chirurgie orthopédique prennent pour modèle les chirurgies du grasset du chien (ostéotomie du plateau tibial ou réparation de rupture de ligaments croisés) (Conzemius et al., 1997; Hoelzler et al., 2004; Gruet et al., 2011; Freise et al., 2012). L'efficacité et la tolérance de traitements antalgiques sont évaluées sur des groupes de patients homogènes en condition clinique. En dépit de la rigueur des études qui traitent de la douleur lors de chirurgie orthopédique, les conclusions provenant des évaluations de la douleur en condition clinique ne peuvent être extrapolées à l'ensemble des situations cliniques sans perdre en niveau de preuve. Outre les études de douleur réalisées en condition clinique, l'instabilité articulaire induite par chirurgie chez le chien est également un modèle de douleur orthopédique canin (Pond and Nuki, 1973; Adams and Pelletier, 1988; Brandt et al., 1991; Bey et al., 2011). De telles études ont peu été utilisées pour valider des méthodes de douleur postopératoire chez le chien mais ces modèles ont été utiles pour étudier l'efficacité de traitement anti-inflammatoire et analgésique.

2.3.2.2.2 La validité des méthodes de mesure de la douleur postopératoire chez le chien

La mesure de la sensibilité nociceptive à l'aide d'un algésimètre mécanique est fréquente au cours des études de la douleur orthopédique canine (Hoelzler et al., 2005; Rasmussen et al., 2006; Drygas et al., 2011; Moak et al., 2011). La sensibilisation mécanique mesurée dans les conditions

de chirurgie orthopédique suivant l'administration d'AINS (Bergmann et al., 2007; Moak et al., 2011) et d'anesthésiques locaux (Hoelzler et al., 2005; Rasmussen et al., 2006; Bergmann et al., 2007) n'est pas différente de la sensibilisation mécanique des chiens sous la même condition chirurgicale et traités avec un placebo. Par contre, la sensibilisation mécanique est augmentée après une ovariohystérectomie (Hancock et al., 2005) et est diminuée chez des chiennes ovariohystérectomisées et traitées avec de la péthidine (Lascelles et al., 1997). Comme pour les études sur la sensibilité nociceptive chez les bovins, les morphiniques diminuaient la sensibilité nociceptive lors de douleur postopératoire. L'absence significative de mesure de la sensibilisation en condition chirurgicale orthopédique pourrait être due à une moindre sensibilité du test à répondre aux AINS et aux anesthésiques locaux par comparaison aux morphiniques (Guirimand et al., 1995; Bustamante et al., 1996) dont l'activité neuroptanalgésique et sédatrice résiduelle après une chirurgie diminue également les mouvements réflexes de retrait (Fowler et al., 2003; Slingsby et al., 2006). Également, la difficulté à mesurer des niveaux de sensibilisation, dans les études précédemment citées, pourrait être reliée au manque d'études de fiabilité et de la validité de l'utilisation des méthodes. En effet, ce n'est que récemment que des algésimètres mécanique (Dixon et al., 2010) et thermique (Hoffmann et al., 2012) ont été développés et testés chez le chien sain (Dixon et al., 2010). La stratégie de validation repose sur la différence de seuils perçus après l'administration de morphinique. Le seuil de réponse n'était pas différent entre deux temps de mesure et le seuil de réponse nociceptive augmentait après l'administration de méthadone (Hoffmann et al., 2012) et de butorphanol (Hoffmann et al., 2012) chez le chien, ce qui supporte la

validation de construit. À ce jour, le test thermique n'a pas encore été testé sur la douleur orthopédique chirurgicale.

La mesure électroencéphalographique chez des chiennes ovariohystérectomisées a démontré une activité neuronale modulée en présence d'opioïdes (Kongara et al., 2010). Cette méthode semble avoir sa place pour démontrer l'activité antihyperalgésique des analgésiques en démontant la synchronisation de l'activité neuronale, ou potentiel évoqués du cerveau, lorsque les chiens opérés ont une administration de morphine ou de tramadol (Kongara et al., 2013). Cependant, cette méthode reste limitée à l'étude de la douleur des animaux sous anesthésie et n'a pas été testée en condition de douleur chirurgicale orthopédique.

La douleur postopératoire d'origine orthopédique a été mesurée à l'aide des échelles GCMPS et UMPS, dites validées. Des études ont supporté la validité de construit de GCMPS parce que les scores obtenus lors de douleur postopératoire orthopédique étaient supérieurs à ceux obtenus après une chirurgie des tissus mous (Morton et al., 2005). Ces résultats étaient cohérents avec l'avis des vétérinaires qui jugent la douleur orthopédique comme étant plus intense que la douleur des tissus mous (Wenger et al., 2005). La validité était également supportée par les scores de douleur plus faibles après l'application de compresse froide sur la plaie chirurgicale par comparaison à des chiens sans compresse (Drygas et al., 2011). En revanche, ces échelles GCMPS et UMPS manquent de spécificité car elles ne différencient pas les effets analgésiques des AINS aux effets analgésiques d'un coxib (Gruet et al., 2011) et du fentanyl (Lafuente et al., 2005) lors de chirurgie orthopédique. La validation de l'utilisation de ces échelles pourrait être remise en cause car la fiabilité, les associations avec d'autres mesures de la douleur et l'influence de facteurs confondants à la mesure n'ont pas été

exploitées. Finalement, une liste non exhaustive d'études d'efficacité d'analgésique montre que ces échelles d'intensité de douleur ne peuvent pas différencier un traitement analgésique d'un traitement placebo (Tableau V), ce qui ne valide pas l'utilisation des échelles pour la douleur.

De nombreuses études de la douleur postopératoire orthopédique ont utilisé des échelles (Vasseur et al., 1995; Sammarco et al., 1996; Pibarot et al., 1997) qui n'ont pas été développées et validées selon les stratégies développées en psychométrie. Ces instruments se composent de critères physiologiques et de critères comportementaux (Pibarot et al., 1997; Budsberg et al., 2002; Grisneaux et al., 2003) incluant une mesure de l'activité motrice, de la boiterie (Grisneaux et al., 2003; Rasmussen et al., 2006) et de la réponse comportementale suivant une manipulation du membre opéré (Grisneaux et al., 2003; Kona-Boun et al., 2006). Si les instruments de type UMPS et GCMPS se composent de mesure du comportement en général, les échelles non reconnues, elles, sont basées surtout sur l'évaluation du comportement spécifique et particulièrement le comportement moteur. Bien que les qualités métriques de tels instruments n'aient pas été étudiées, les mesures de ces instruments sont sensibles aux opioïdes en administration épidurale (Day et al., 1995; Kona-Boun et al., 2006), aux anesthésiques locaux administrés en préopératoire par voie épidurale (Bergmann et al., 2007). Toutefois, ces instruments de mesure sont peu sensibles à la réponse au traitement quand les opioïdes et anesthésiques locaux sont administrés par voie intra-articulaire ou régionale (Sammarco et al., 1996; Rasmussen et al., 2006) ou quand le méloxicam, un AINS, est administré par voie sous-cutanée ou intra-articulaire (Moak et al., 2011). Également, les échelles non validées ne différencient pas l'effet de différentes classes analgésiques, notamment l'effet des opioïdes comparé à celui des anti-inflammatoires (Reese et al.,

2000; Grisneaux et al., 2003; Laredo et al., 2004; Bergmann et al., 2007; Bosmans et al., 2007). La fiabilité et la validité de l'utilisation de ces échelles d'intensité de douleur ne sont pas supportées par ces études chez le chien en douleur aiguë.

L'analyse, par observation directe et par la vidéo-analyse, des changements des comportements associés à la douleur postopératoire est peu décrite chez le chien. La fiabilité des mesures (fiabilité intra- et inter-observateur, test-retest) n'est pas décrite dans les études sur le comportement (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000). Pour la vidéo-analyse, une analyse en composante principale (validité de contenu) a permis de séparer l'effet d'un traitement à l'hydromorphone d'un traitement placebo sur le comportement chez des chiennes ovariectomisées (Fox et al., 2000). De cette liste de comportements, aucune échelle comportementale n'a été développée. En revanche, l'échelle UMPS a été développée à l'aide de la vidéo-analyse dont la fiabilité inter-observateur (analyse de Bland-Altman) était satisfaisante. L'analyse des comportements qui différenciaient les 36 chiennes ovariectomisées en fonction de deux groupes de traitement (acépromazine comparé à acépromazine et butorphanol) et 12 chiennes non ovariectomisées a supporté la validation de contenu et de construit lors du développement de l'échelle UMPS.

Les changements des comportements associés à la douleur postopératoire chez le chien ont été mesurés selon différentes approches. Il est démontré que l'intensité de l'activité motrice, mesurée par accélérométrie (Culp et al., 2009) ou par vidéo-analyse (Fox et al., 2000) diminuent chez des chiennes durant 24 heures après une ovariohystérectomie. L'étude des changements du comportement naturel enregistré par vidéo-analyse n'a pas été réalisée chez le chien après une chirurgie orthopédique. Néanmoins, il n'y

a pas de description précise des comportements affectés par la douleur chez un chien après une chirurgie orthopédique.

De nombreuses études ont établi que la boiterie est un comportement de douleur orthopédique. Chez le chien, les mesures cinétiques (plateformes de force), par exemple le pic de la force verticale d'appui de la patte (PFV) et l'impulsion verticale lors de la marche, sont usuellement utilisées comme des marqueurs de la boiterie. Les forces d'appui de la patte au sol diminuent lors de boiterie inflammatoire induite par une substance algogène (Borer et al., 2003; Hazewinkel et al., 2003), augmentent après administration d'AINS lors de synovite (Toutain et al., 2001; Lipscomb et al., 2002; Hazewinkel et al., 2003; Hazewinkel et al., 2008) et augmentent après une chirurgie réparatrice articulaire (Conzemius et al., 2005) chez le chien. Ces résultats obtenus sur des modèles d'inflammation articulaire supporteraient la validité de l'utilisation des paramètres cinétiques pour l'étude de la douleur articulaire d'origine inflammatoire chez le chien.

Certains auteurs ont rapportés que l'administration d'AINS augmentait le PFV alors que les scores de boiterie, mesurés à l'aide d'échelle unidimensionnelle de douleur, étaient identiques entre les chiens traités aux AINS et ceux non traités après une chirurgie articulaire (Grisneaux et al., 2003; Horstman et al., 2004). Des études de validation convergente montrent une absence de corrélation entre le PFV et les scores d'échelles d'intensité de douleur, EVA et ENS. Cette absence de corrélation peut être expliquée par une absence de fiabilité des scores de douleur (non calculée dans ces études) et une absence de la validité de l'utilisation des échelles de douleur (Horstman et al., 2004; Quinn et al., 2007; Waxman et al., 2008; Oosterlinck et al., 2011). Également, le manque de postulat de départ pour lequel la mesure de la boiterie est une mesure de la douleur (Horstman et al., 2004)

pourrait être remis en cause car l'instabilité articulaire pourrait créer des troubles de la démarche qui ne sont pas corrélées à la douleur ressentie. Ainsi, la mesure de PFV est fiable mais la mesure de la boiterie comme seule indicatrice de douleur (validation de construit) ne serait pas une bonne théorie ou encore, la mesure de PFV serait valide mais la valeur serait influencée par des facteurs mécaniques non associés à la douleur (facteurs influençants).

En recherche clinique, les paramètres physiologiques sont des critères usuels de l'évaluation péri- et postopératoire de la douleur. Les mesures physiologiques (fréquences cardiaque, respiratoire, pression artérielle ...) ne sont pas corrélées aux changements des scores mesurés à l'aide d'échelles simplifiées de douleur (Conzemijs et al., 1997). Ces paramètres physiologiques souffrent d'un manque de sensibilité et de spécificité en raison de l'influence des analgésiques sur les paramètres physiologiques, de la grande variabilité individuelle et de l'aspect fugace des changements des valeurs physiologiques (Conzemijs et al., 1997; Hansen et al., 1997; Holton et al., 1998a; Morton et al., 2005).

Une forte cortisolémie est associée à un déficit d'appui lorsqu'il y a une synovite induite (Feldsien et al., 2010). L'hypercortisolémie est également observée après une chirurgie orthopédique (Leibetseder et al., 2006; Gruet et al., 2011). L'hypercortisolémie plasmatique dure moins de 3 heures suivant la fin de la chirurgie (Leibetseder et al., 2006; Gruet et al., 2011). Les concentrations plasmatiques de cortisol ne sont pas différentes entre des chiens traités avec du méloxicam de ceux traités avec du robénacoxib (Gruet et al., 2011). Également, les échelles de douleur (principalement comportementales) ne sont pas corrélées aux mesures des paramètres physiologiques et de la cortisolémie plasmatique (Conzemijs et al., 1997). Si les mesures endocriniennes révèlent une réponse de stress

concomitante à la douleur chirurgicale ou inflammatoire (Feldsien et al., 2010; Gruet et al., 2011), aucune étude ne permet de relier l'augmentation de la cortisolémie plasmatique à la douleur ressentie lors de douleur orthopédique postopératoire. Ces résultats font de la cortisolémie plasmatique un mauvais indicateur pour l'étude de la douleur postopératoire à la fois pour la fugacité des changements des concentrations plasmatiques et le manque de spécificité.

2.3.2.2.3 *Synthèse*

La validité de l'utilisation d'une mesure est généralement acquise à l'issue d'une étude pour une condition donnée et sur une population donnée. Les stratégies de validation des mesures de la douleur avec les méthodes usuelles (test de sensibilité, échelles d'intensité de douleur, vidéo-analyse, mesure de stress et analyse cinématique) ne montrent pas de cohérence dans les résultats des études. En particulier, la différence de réponse au traitement AINS entre l'algésimétrie, les échelles d'intensité de douleur et le PFV pourrait être expliquée par le manque de fiabilité et de validité des mesures. À l'exception des études de développement de méthodes, la fiabilité des tests de sensibilité avec l'algésimétrie, les échelles de douleur et l'analyse du comportement est peu décrite. La pertinence du choix de ces méthodes à mesurer la douleur postopératoire, l'influence de facteurs confondants, la relation entre les variables mesurées manquent dans l'analyse de la validité de l'utilisation des méthodes de la douleur postopératoire chez le chien.

Parmi les méthodes exposées, les études de validation sur l'algésimétrie seraient à confirmer lors de douleur articulaire postopératoire. Les échelles dites validées (GCMPS et UMPS) ne semblent pas meilleures que les échelles non validées en terme de réponse au traitement. La mesure

comportementale par vidéo-analyse est absente dans les études de douleur orthopédique. La mesure de la boiterie objectivement quantifiable à l'aide d'étude cinétique et cinématique par exemple est empiriquement acceptée comme une mesure de référence de la douleur. Finalement, le dosage de biomarqueurs neurologiques pouvant être indicateur de la nociception est absent des travaux présentés pour l'évaluation de la douleur orthopédique postopératoire.

2.3.2.3 Les évaluations de la douleur causée par l'arthrose chez le chien

2.3.2.3.1 L'arthrose et son lien à la douleur

L'arthrose est une maladie musculosquelettique qui touche 20% de la population canine en Amérique du Nord et 80% des chiens âgés (Johnston, 1997). L'anormalité biomécanique associée à l'arthrose provoque des réponses biologiques de nature inflammatoire, par exemple la relâche de cytokines pro-inflammatoires, et la modulation de l'homéostasie articulaire en favorisant, par exemple, la relâche d'enzymes de dégradation des matrices cartilagineuses et la relâche de radicaux libres (Brandt et al., 2006; Schaible et al., 2006). L'arthrose n'est pas uniquement une défaillance unique du tissu cartilagineux expliquée par un déséquilibre entre l'activité catabolique et anabolique des chondrocytes à remodeler la matrice extracellulaire du cartilage (Loeser, 2006). Selon des théories récentes, l'arthrose peut provenir de la défaillance de n'importe quel tissu constituant l'articulation, à savoir de l'os sous-chondral, des ligaments, des muscles, des nerfs et du synovium (Dieppe, 2011). D'un point de vue morphologique, l'articulation arthrosique se caractérise par la perte de cartilage hyalin et par la réponse de l'os sous-chondral menant à des croissances marginales, à la formation d'ostéophytes et à la sclérose sous-chondrale. D'un point de vue symptomatique, l'arthrose

provoque une perte de la mobilité et de la fonction locomotrice. Le symptôme clinique fréquent associé à l'arthrose est une douleur au niveau de l'articulation qui est amplifiée avec la charge sur l'articulation et l'activité (Johnston, 2001; Johnston et al., 2008).

Le mécanisme neurophysiologique de la douleur sous-jacent à l'arthrose n'est pas complètement résolu (Abramson and Attur, 2009; Schaible et al., 2009). En effet, alors que le mécanisme pathologique de l'arthrose est lié au stress biomécanique et à la difficulté à maintenir une intégrité du tissu articulaire, les composantes de la douleur sont d'ordre nociceptives, inflammatoires et neurogéniques (Hochman et al., 2010; Im et al., 2010; Li et al., 2011). Il est démontré que la source de la douleur est liée à la présence des nerfs afférents nociceptifs (fibres C et A δ) dont l'activité des canaux ioniques mécano-sensibles (notamment les canaux sodiques voltage dépendant NaV_{1.8}) est dramatiquement augmentée lors d'un mouvement, d'une charge articulaire anormale et lors de charge articulaire normale avec des nocicepteurs sensibilisés (Schaible et al., 2006; Schuelert and McDougall, 2012). L'arthrose n'est pas considérée comme une pathologie inflammatoire mais elle peut être associée à de l'inflammation, ce qui favorise l'activation de lymphocytes et la production de médiateurs pro-inflammatoires (prostaglandines, oxyde nitrique, chimiokines et cytokines (IL6, IL-1, TNF α par exemple)) ayant un rôle important dans la sensibilisation mesurée au niveau de l'articulation arthrosique (McDougall, 2006; Schaible et al., 2010). Une fois le mécanisme catabolique déclenché, les médiateurs de l'inflammation favorisent la production d'enzymes cataboliques qui auto-entretiennent et potentialisent la réponse inflammatoire et la dégradation de la matrice extracellulaire. Le maintien du mécanisme catabolique est également favorisé par l'induction et l'activation de facteurs de transcription, incluant

par exemple NFκB, eux même impliqués dans l'inflammation et le stress tissulaire (Goldring and Goldring, 2007). Clairement, la sensibilisation neurogénique associée à l'arthrose a pour origine la relâche au niveau de l'articulation de médiateurs de l'inflammation et de substances pronociceptives (substances qui augmentent la sensibilité à la douleur) (McDougall, 2006; Harvey and Dickenson, 2009). Cliniquement, les patients humains présentent une sensibilisation centrale qui est évaluée par une perte d'inhibition de la douleur d'origine centrale et par une hyperexcitabilité neuronale (Arendt-Nielsen et al., 2010; Graven-Nielsen and Arendt-Nielsen, 2010). Expérimentalement, les modèles rongeurs d'arthrose ont confirmé une sensibilisation mesurable à l'aide de stimulation nociceptive de type mécanique et thermique (Harvey and Dickenson, 2009; Schuelert and McDougall, 2009; Im et al., 2010; Li et al., 2011).

2.3.2.3.2 Les modèles d'arthrose chez le chien

Les modèles d'arthrose canins chirurgicaux sont prédominants et principalement représentés par des chirurgies du genou telles que la transection du ligament croisé crânial (antérieur selon la nomenclature humaine) (Pond and Nuki, 1973), le modèle de groove induisant un trauma au tibia (Mastbergen et al., 2006; Intema et al., 2008), la ménisectomie (Lindhorst et al., 2000), l'ostéotomie (Inerot et al., 1991; Panula et al., 1997), les défauts du cartilage (Wang et al., 2000; Breinan et al., 2001) et l'abrasion articulaire (Altman et al., 1992). Il existe également des modèles d'arthrose induits chimiquement par une administration intra-articulaire de substance algogène, par exemple, de solution de iodoacétate ou de cristaux de calcium pyrophosphate (Myers et al., 1995; Bendele, 2001). Ces derniers modèles sont peu utilisés pour l'étude de l'arthrose et induisent essentiellement un synovite (Myers et al., 1995).

De façon intéressante, l'instabilité articulaire provoquée par les modèles d'arthrose chirurgicaux (Pond and Nuki, 1973; Brandt et al., 1991; Mastbergen et al., 2006) induisent une progression lente de l'arthrose qui se traduit par l'apparition de lésions cartilagineuses telles que l'amincissement du volume cartilagineux, la sclérose de l'os sous-chondral et de l'os trabéculaire dont la mesure est réalisée à l'aide de la grille de Mankin (Kuroki et al., 2011). Ces modèles chirurgicaux ont leur place dans l'étude de l'arthrose car les lésions induites ressemblent aux lésions articulaires observées sur les articulations de patients atteints d'arthrose (Cook et al., 2010). En revanche, ces modèles chirurgicaux d'arthrose du genou ont pour caractéristique d'être des modèles d'arthrose post-traumatiques et d'être localisés sur une seule articulation (Little and Hunter, 2013). Ces caractéristiques peuvent limiter la validité prédictive des modèles chirurgicaux par comparaison à la douleur arthrosique d'origine naturelle. En effet, le chien est une espèce sensible à l'arthrose. L'arthrose du chien est souvent secondaire à une maladie musculosquelettique et exacerbée chez le chien âgé et obèse (Vainio, 2012). Dès lors, le modèle d'arthrose naturelle du chien semble plus prédictif de la douleur causée par l'arthrose car il représente toute la diversité symptomatologique de la maladie.

2.3.2.3.3 La validité des méthodes de mesure de la douleur liée à l'arthrose chez le chien

Les variables qui peuvent être mesurées pour quantifier l'arthrose sont la douleur, les troubles de la démarche, la fonction articulaire, les changements morphologiques et histologiques par imagerie médicale et les marqueurs biochimiques de l'homéostasie articulaire (Poole et al., 2010). Nous allons exposer ici les stratégies de validation des méthodes utilisées pour quantifier la douleur liée à l'arthrose canine.

Il existe de nombreuses échelles de douleur adaptées pour la mesure de l'arthrose. Historiquement, l'échelle de douleur clinique de Vasseur et al., (Vasseur et al., 1995; Black et al., 2007) et ses formes dérivées (Pollmeier et al., 2006; McCarthy et al., 2007) ainsi que le *Standard Orthopaedic Questionnaire*, utilisé par les propriétaires de chiens (Gingerich and Strobel, 2003; Black et al., 2007), sont les premiers instruments utilisés empiriquement pour évaluer la douleur liée à l'arthrose canine. Ces instruments n'ont pas été évalués pour leurs qualités psychométriques. Cependant, ces échelles sont sensibles aux traitements car, chez des chiens arthrosiques, les scores de douleur diminuent après l'administration de carprofène (Vasseur et al., 1995), de chondromodulateurs (McCarthy et al., 2007), de traitements non conventionnels (Gingerich and Strobel, 2003) et un traitement par thérapie cellulaire (Black et al., 2007).

Les échelles validées CBPI et HCPI sont sensibles au carprofène (Brown et al., 2008; Hielm-Björkman et al., 2009a; Hielm-Björkman et al., 2009c). La LOAD ne permet pas de différencier des chiens traités sous placebo de ceux traités au carprofène (Hercock et al., 2009) alors que la validité de construit de l'instrument a été approuvée récemment sur une importante cohorte de 222 chiens arthrosiques (Walton et al., 2013). Parmi les traitements non conventionnels, CBPI n'est pas sensible à l'effet de l'antioxydant S-adenosyl L-méthionine (Imhoff et al., 2011) et HCPI est modérément sensible à l'effet de substance nutraceutique et homéopathique (Hielm-Björkman et al., 2009c; Hielm-Björkman et al., 2009b). De façon intéressante, les échelles CSOM sont sensibles à l'effet cumulé du carprofène et de l'amantadine (Lascelles et al., 2008). Toutes études confondues, l'ensemble de ces échelles et instruments sont sensibles aux effets analgésiques et anti-inflammatoires du carprofène, à l'exception de LOAD,

mais les instruments sont également variablement sensibles à des classes thérapeutiques non conventionnelles du traitement de la douleur associée à l'arthrose. Cette variabilité de réponse au traitement entre les instruments suppose une validité de construit différente entre les instruments de mesure de la douleur chronique.

La composition des échelles de mesure de la douleur arthrosique chez le chien est très diversifiée ce qui rend difficile la comparaison des qualités métrologiques des échelles dites validées (Tableau VI). Une étude de validation des échelles CBPI, LOAD et HCPI a comparé les validités de critère et de construit des échelles CBPI, LOAD et HCPI sur une même population de 222 chiens arthrosiques (Walton et al., 2013). Les échelles sont significativement mais faiblement corrélées entre elles, ce qui démontre une validation de convergence entre les échelles. L'analyse factorielle était réalisée pour chaque échelle et montrait différentes dimensions pour ces échelles CBPI, LOAD et HCPI (Walton et al., 2013). Curieusement, l'analyse factorielle de CBPI identifie deux dimensions dans l'étude de Brown et al., (2007) et une seule dimension pour l'étude de Walton et al., (2013). Les dimensions calculées par analyse factorielle pour HCBPI diffèrent également entre l'étude originale (Hielm-Björkman et al., 2011) et celle de Walton et al., (2013). Cela suggère que les échelles CBPI, LOAD et HCPI ne mesurent pas les mêmes variables latentes et que la définition théorique de la douleur arthrosique n'a pas été traduite de la même façon entre les trois échelles testées sur des populations arthrosiques différentes dans des conditions différentes. De plus, la fiabilité des mesures des échelles de douleur CBPI, HCPI et LOAD n'a pas été testé au cours des études d'efficacité des traitements anti-inflammatoires chez des chiens avec arthrose (Brown et al., 2008; Hielm-Björkman et al., 2009b; Hielm-Björkman et al., 2009c; Walton

et al., 2013). Cela suppose que la validité de l'utilisation des échelles de mesure n'a pas été confirmée pour les instruments dits 'validés' que sont CBPI, HCPI et LOAD.

La douleur associée à l'arthrose s'accompagne d'une élévation d'hormones de stress (adrénaline, β -endorphine, cortisol, vasopressine plasmatique) (Hielm-Björkman et al., 2003). Cependant, le dosage de ces hormones démontre une très grande variabilité individuelle (Hielm-Björkman et al., 2003). Il n'y a pas de corrélation entre la douleur mesurée à l'aide de l'échelle HCPI et les hormones de stress (Hielm-Björkman et al., 2003).

Chez le chien, la douleur et la boiterie sont étroitement liées à l'expression comportementale de l'arthrose (Johnston, 2001). C'est pourquoi, des méthodes de mesure de la fonction locomotrice ont gagné en importance pour évaluer l'efficacité thérapeutique des traitements associés à l'arthrose en médecine vétérinaire. L'analyse cinétique a supplanté les mesures subjectives de la douleur. Particulièrement, les mesures des forces de réaction au sol et les mesures d'impulsion sont utilisées pour évaluer les changements fonctionnels d'une patte arthrosique chez le chien (DeCamp, 1997; Budsberg et al., 1999; Budsberg, 2001; Moreau et al., 2003). Ces mesures sont fiables (test-retest) (Jevens et al., 1993; Bockstahler et al., 2007) sous couvert de collecte de données standardisées. En se référant à une amélioration de l'appui de 5% entre deux temps de mesure pour le PFV (Vasseur et al., 1995), l'analyse cinétique a démontré l'efficacité thérapeutique des AINS (Vasseur et al., 1995; Budsberg et al., 1999; Moreau et al., 2003; Moreau et al., 2007), de chondromodulateurs (Moreau et al., 2004; Moreau et al., 2012), de traitements non conventionnels (Hielm-Björkman et al., 2009c; Roush et al., 2010) et de thérapeutique chirurgicale (Conzemius et al., 2005) par comparaison à des chiens non traités. Ces résultats sembleraient supporter le

PFV comme une mesure de la douleur et de la boiterie associée à l'arthrose mais des questions sont posées quant aux limitations de cette méthode de mesure pour la douleur. Tout d'abord, les niveaux d'amélioration (changement relatif) sont faibles et similaires entre les traitements à activité analgésique, anti-inflammatoire et structurelle. Ceci démontre un effet plafond des mesures et suggère un manque de spécificité vis-à-vis de l'agent thérapeutique (Hielm-Björkman et al., 2009c; Hielm-Björkman et al., 2009b) ou une sensibilité modérée en raison de chiens qui répondent et des chiens qui ne répondent pas aux traitements de l'arthrose (Lipscomb et al., 2002). L'arthrose peut toucher de nombreuses articulations, ce qui questionne alors sur la redistribution des forces d'appui et la variabilité des mesures au cours du temps (DeCamp, 1997). Finalement, c'est le lien entre la douleur et les changements de la démarche qui est au cœur du sujet. Chez le rat, la douleur exprimée et la sensibilisation nociceptive ont été mesurées sur des modèles d'arthrose induite chimiquement ou chirurgicalement (Fernihough et al., 2004; Bove et al., 2006). Néanmoins, chez le rat, l'analyse cinétique n'était pas un bon indicateur de douleur neuropathique (Mogil et al., 2010) et de douleur chronique (Gabriel et al., 2009). Chez le chien, une récente étude a démontré que des chiens arthrosiques présentaient une sensibilité mécanique et thermique par rapport à des chiens non arthrosiques (Brydges et al., 2012). De façon conjointe, les chiens arthrosiques démontraient une réduction de PFV et de l'impulsion verticale lors de l'appui de la patte arthrosique. Or, les méthodes de mesure de la structure et de la fonction articulaire (mesurée avec le PFV ou l'impulsion verticale) n'ont pas permis de valider un traitement analgésique à action centrale (Boileau et al., 2005). Ceci suggérerait, sous couvert de traitements analgésiques efficaces, que les méthodes de mesure usuelles de la fonction articulaire ne seraient pas ou peu sensibles à la mesure

de la douleur centrale ou bien, que ces méthodes sont sensibles à la douleur centrale mais la mesure perdrait de sa valeur lors de perte d'activité motrice induite par les agents analgésiques à activité sédatrice (Ferreira-Gomes et al., 2012). Finalement, une étude randomisée en double aveugle démontrait que des chiens arthrosiques traités au carprofène durant 14 jours avaient une diminution des scores de douleur mesurés avec CBPI et augmentaient leur appui de patte arthrosique (Brown et al., 2013). Or, il n'y avait pas de corrélation (validité convergente) entre la mesure de la force d'appui au sol et le score de douleur (Brown et al., 2013). Ces résultats suggèreraient que la mesure de la fonction cinétique et la mesure de la douleur avec une échelle de douleur, telle que CBPI, ne mesurent pas le même construit ou ne présentent pas les mêmes fiabilités et validités de mesure.

La perte de mobilité spontanée chez les animaux est assimilée à de la douleur et de la perte de fonction motrice (Gegout-Pottie et al., 1999). L'activité motrice spontanée mesurée à l'aide d'accéléromètre diminuait chez des chiens arthrosiques et était sensible à l'effet anti-inflammatoire et analgésique du carprofène (Brown et al., 2010a). Cependant, le lien qui unit la mesure de l'activité à celle de la douleur n'a pas été établi pour cette méthode de mesure. De plus, l'activité motrice (Hansen et al., 2007; Preston et al., 2012) est dépendante de l'âge et le poids corporel chez le chien (Brown et al., 2010b). Par conséquent, la recherche de facteurs confondants à la mesure est nécessaire pour quantifier de la douleur.

Récemment, des tests de sensibilisation mécanique (Briley et al., 2013), thermique (Brydges et al., 2012; Williams et al., 2014) et un test de von Frey (Brydges et al., 2012; Briley et al., 2013; Moore et al., 2013) ont été appliqués sur des chiens sains et arthrosiques. Des calculs de corrélations avec CBPI (Williams et al., 2014), la comparaison de chiens normaux et de

chiens avec une rupture du ligament croisé (Brydges et al., 2012; Moore et al., 2013) sont les méthodes utilisées pour étudier la validation des tests de sensibilité. Les résultats montrent une plus grande sensibilité chez des chiens arthrosiques (Brydges et al., 2012; Briley et al., 2013) et chez des chiens avec une compression au niveau spinal (Moore et al., 2013). Néanmoins, la fiabilité des tests n'a pas été analysée ou étudiée avec une analyse de Bland-Altman (Williams et al., 2014) comme preuve du 'test-retest'. Ainsi, la méthodologie de réalisation du test semble le point clé à l'origine d'erreurs de mesure, ce qui justifierait une évaluation systématique de la fiabilité des mesures de sensibilité (Briley et al., 2013; Williams et al., 2014).

2.3.2.4 Synthèse

Des échelles de douleur chronique chez le chien ont été développées, testées et utilisées dans différentes populations d'arthrose, ce qui permet d'analyser la validité de l'utilisation de ces échelles pour étudier la douleur chronique du chien. Les résultats des études de validation de construit des échelles (analyse factorielle) de douleur HCPI, CBPI et LOAD ne concordent pas lorsque les tests sont appliqués sur des populations différentes et la corrélation ($r < 0,30$) entre les scores des échelles est faible (validation convergente). Les paramètres cinétiques de la démarche sont établis comme valides pour mesurer la douleur. Cependant, les liens entre la douleur mesurée avec une échelle de douleur et les diminutions des paramètres cinétiques ne sont pas ou peu corrélés.

Même si les instruments ne semblent pas mesurer le même construit, les méthodes usuelles (échelle ou instrument de la douleur, plateformes de forces et l'accélérométrie) ont démontré l'efficacité des AINS dans la gestion de l'arthrose. Cependant, peu d'études ont été conduites avec des

analgésiques différents des anti-inflammatoires (par exemple, antidépresseur, anti-hyperalgésique....) pour valider l'utilisation de ces méthodes chez le chien. Également, il n'y a encore peu de mesure spécifique aux mécanismes nociceptifs et de recherche des liens qui unissent les mesures comportementales à celles de la douleur.

2.3.3 Caractéristiques de la validation de la mesure de la douleur en médecine vétérinaire

Les stratégies de validation reposent sur le calcul de fiabilité et des validités de contenu, de construit et de convergence dans une population donnée et une condition spécifique (Holton et al., 2001; Wiseman-Orr et al., 2004; Reid et al., 2007). On peut retenir que la médecine vétérinaire a validé des méthodes selon les théories psychométriques défendues depuis les années 50 (Cronbach and Meehl, 1955). La validité de l'utilisation de la méthode de mesure de la douleur n'est pas établie pour différentes conditions et populations différentes. Surtout, l'étude de la validité a été appliquée pour certains instruments, l'application des stratégies de fiabilité et de validité est inconstante voire inexistante pour de nombreuses études de validation et d'utilisation des mesure de la douleur chez le chien et le bovin.

Parmi les instruments de la douleur, les échelles de douleur (par exemple, l'échelle de douleur postopératoire GCMPS et sa forme réduite (Holton et al., 2001; Murrell et al., 2008) ainsi que les échelles de douleur chronique CBPI (Brown et al., 2009) et HCBPI (Hielm-Björkman et al., 2003; Hielm-Björkman et al., 2011)) sont les instruments les plus étudiés pour leurs propriétés psychométriques à l'aide de la théorie classique de la mesure. La validité de l'utilisation des ces méthodes n'est pas claire à ce jour.

Des échelles développées chez l'animal (Holton et al., 2001; Brown et al., 2007) sont issues de théories et de construits développés en humaine (Melzack, 1975). Une des limites de cette approche serait que les échelles, et les indicateurs de douleur, mesurent la douleur alors que la pertinence de ces mesures appliquées à la douleur animale ne repose pas sur une théorie claire. Par exemple, une analyse de l'échelle GCMPS suggère qu'une augmentation de l'anxiété traduit une sévérité croissante de douleur. Cependant, si l'anxiété réfère à une composante émotionnelle chez l'homme (Melzack and Wall, 1965), l'anxiété n'est pas citée dans la définition de la douleur chez l'animal. Également, en l'absence de théorie et de définition plus précise de la douleur chez l'animal, le risque est que les instruments ne mesurent pas uniquement de la douleur mais également tout changement non associé à la douleur. Par exemple, une analyse du contenu de l'échelle GCMPS suggère qu'une augmentation de la vocalisation traduit une sévérité croissante de douleur, or l'analyse de la communication non verbale comme indicateur de douleur n'a pas été validée chez des chiens douloureux par comparaison à des chiens normaux. Ces remarques suggèrent que les construits n'ont pas été clairement définis en médecine vétérinaire, ce qui peut rendre l'utilisation de la méthode invalide pour la mesure de la douleur.

En résumé, le manque d'information et d'uniformité de la validité des mesures de la douleur animale est problématique. Ces points limiteraient l'inférence, la translation et la comparaison entre les études de la douleur chez les animaux. Le manque de validité de l'utilisation des mesures de la douleur pourrait remettre en cause une définition globale de la douleur chez l'animal et revendiquer une approche spécifique de la validation de la mesure en fonction des espèces. Finalement, le manque de données de validation de l'utilisation des mesures pour la douleur est une véritable problématique pour

faire un choix adéquat de méthodes de mesure de la douleur en recherche et en clinique.

2.4 Questions de recherche

Les postulats de départ sont que la perception douloureuse est la même pour des espèces différentes (bovin et chien) et que les méthodes de mesure de la douleur peuvent être communes aux espèces animales sur la base d'une définition de la douleur animale commune entre les animaux.

L'étude de recherche pose la question de la validation de la mesure de la douleur, appliquées à deux espèces différentes (bovin et chien) et pour des conditions de douleur différentes (viscérale, orthopédique d'origine chirurgicale et liée à l'arthrose).

Au cours du programme de recherche, on évaluera les validités des mesures, pour une population spécifique et un contexte donné, en se basant sur les questions suivantes :

1) Chez le bovin en douleur viscérale aiguë et chronique, est-ce que les évaluations comportementales (échelles de douleur et mesures objectives), les mesures physiologiques (mesure de la réponse sympathique) et les indicateurs neurophysiologiques (bio-marqueurs et test de sensibilisation) associés à la douleur reflètent différentes intensités de douleur, sont des mesures fiables et valides (validation de construit) ? Et est-ce que les qualités psychométriques permettent de faire un tri préliminaire des meilleurs indicateurs de la douleur aiguë et chronique ?

2) Sur la base des connaissances de la validité des mesures chez le bovin, est-ce que les évaluations comportementales (échelles de douleur et

mesures objectives), les mesures physiologiques (mesure de la réponse sympathique) et les indicateurs neurophysiologiques (bio-marqueurs et test de sensibilisation) associés à la douleur reflètent différentes intensités de douleur, sont des mesures fiables et valides chez le chien en douleur expérimentale articulaire aiguë et chronique (2 études) (validation de construit) ?

3) Si oui, quels sont les liens qui unissent les mesures subjectives à celles issues des méthodes objectives (jugées méthodes de référence) de la douleur (validation de convergence) ? Plus particulièrement, pour les douleurs articulaires du chien, est-ce que la sévérité de la boiterie est un critère de référence de la douleur d'origine articulaire lors de douleur expérimentale aiguë et chronique (validation de critère) ?

4) Finalement, est-ce que des mesures valides en condition expérimentale sont valides (validation de construit et convergente) en condition clinique chez le chien en douleur articulaire ?

2.5 Hypothèses

Les concepts ou théories développés en mesure de la douleur sont, entre autres, de déterminer-la relation qui unit la douleur (cause) à sa mesure (résultats) (Turk et al., 2008; Dworkin et al., 2010; Farrar, 2010). À partir de ce concept et sur la base des études citées dans la recension de littérature, on peut émettre le postulat que l'intensité de douleur (mesures subjectives) et les changements physiologiques, endocriniens, comportementaux et neurophysiologiques établis à l'aide de mesures objectives associées à de la douleur sont liés à la sévérité de la douleur.

L'hypothèse principale de la validation des mesures pour toutes les études repose sur la capacité des méthodes à mesurer différentes intensités de douleur lorsque la douleur induite expérimentalement ou naturelle est modulée par des traitements analgésiques ou conservateurs, respectivement. Ainsi, nous émettons les sous-hypothèses que

- des sujets sains vont présenter des changements des mesures causés par la douleur induite expérimentalement (études #1, #2 et #3),
- des sujets ayant une analgésie multimodale auront de plus faibles changements de mesures de la douleur par comparaison à ceux ayant une analgésie modérée ou une analgésie très faible suivant une douleur aiguë (étude #1) et chronique (études #1 et #2) induite expérimentalement,
- des sujets ayant un traitement conservateur (traitement de l'arthrose) auront de plus faibles changements de mesure de la douleur par comparaison à ceux ayant une administration de placebo suivant une douleur induite expérimentalement (étude #3),
- Des sujets ayant un traitement conservateur (traitement de l'arthrose) ne présenteront pas de changement de comportements causés par la progression naturelle de l'arthrose (étude #4)

Tout à chacun pourrait reprocher à cette hypothèse que le résultat est connu mais la cause, supposée être la douleur, n'est pas réellement connue car la relation entre le dommage tissulaire et l'intensité de douleur ne serait pas forcément de nature cause – effet. Dès lors, la multiplicité des méthodes et la supériorité supposée des méthodes objectives à mesurer la douleur nous permettent de formuler une nouvelle hypothèse. Aussi, pour les modèles articulaires, émettons-nous l'hypothèse que les mesures sont corrélées aux mesures objectives de la boiterie (vidéo-analyse, étude #2 et mesure cinétique

de la démarche, études #3 et #4), et à la sensibilité associée à un dommage articulaire (étude #3).

2.6 Objectifs

Le but de ces études présentées dans cette thèse était d'étendre nos connaissances de la validation de la mesure de la douleur chez les bovins et les chiens selon la définition commune de la douleur chez l'animal. Dans ce but, des pathologistes en médecine vétérinaire et humaine, des pharmacologues, des anesthésistes et une comportementaliste ont collaboré à ce programme de recherche. Une étude durant la Maîtrise réalisée chez les bovins et trois études durant le programme de Doctorat réalisés chez les chiens ont été conduites sur une période totale de six ans. La continuité de l'étude de recherche chez le bovin faisait suite à un passage accéléré au Doctorat, ce qui inclut l'étude de Maîtrise dans la thèse de recherche.

L'objectif commun était d'évaluer la validité de l'utilisation des mesures selon un concept unique pour lequel les mesures répondaient de façon identique sous différentes conditions analgésiques, pour des espèces différentes, sous différentes conditions de douleur.

Durant la Maîtrise, l'objectif spécifique de l'étude portait sur la fiabilité et la validité des échelles de douleur, des mesures comportementales, physiologiques, endocriniennes, sensibles et neurophysiologiques lors de douleur viscérale chez la vache, en conditions expérimentales.

Durant l'étude de Doctorat, trois études chez des chiens atteints de douleur articulaire évaluaient la fiabilité et la validité des échelles de douleur, des mesures comportementales, physiologiques, sensibles et

neurophysiologiques lors de douleur articulaire chez le chien, en conditions expérimentales de douleur aiguë et chronique et en condition clinique de douleur chronique.

Pour répondre aux objectifs, des méthodes de mesure ont été choisies pour chaque domaine de mesure. Cependant, parmi les méthodes usuellement utilisées, aucune n'est considérée comme une mesure de référence de la douleur pour répondre à la question de recherche. En l'absence des connaissances des meilleurs instruments pour mesurer la douleur chez le chien et le bovin, le choix des méthodes pour évaluer la douleur est guidé par des résultats de recherche obtenus chez le chien, le bovin et également d'autres espèces comme le rongeur. Les mesures neurophysiologiques (test de sensibilité, dosage de bio-marqueurs au niveau médullaire et central), l'opportunité d'évaluer différemment les changements de comportements (observation directe et vidéo-analyse) et d'étudier des composantes physiologiques associées au stress comme étant des indicateurs peu valides de la douleur (cortisol) ont guidé le choix des méthodes. L'analyse cinématique est une mesure validée pour les troubles de la locomotion chez diverses espèces comme le chien et le rongeur. Finalement, en l'absence d'échelles de douleur validées (chez la vache et arthrose chez le chien), de doute sur la validité d'échelles à différencier différentes sévérités de douleur au moment des études, des échelles de douleur ont été développées pour les études. Ces échelles n'ont pas fait l'objet de validation de développement avant les études citées dans cette étude.

Nous présentons ci-après les articles publiés, acceptés, ou encore soumis qui apportent autant de nouvelles questions que de réponses.

3 ARTICLES

3.1 Article 1

P. Rialland,* C. Otis,* M.-L. de Courval,* P.-Y. Mulon,† D. Harvey,† S. Bichot,* D. Gauvin,* A. Livingston,‡ F. Beaudry,* P. Hélie,§ D. Frank,† J.R.E. del Castillo,* and E. Troncy* (2014). **Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospective, blinded, randomised and controlled study focusing on spinal pain proteomics.** *J Dairy Sci* 97(4): 2118-2134 (Facteur d'impact sur 5 ans de 3,009).

*Quebec Research Group in Animal Pharmacology (GREPAQ),
Department of Veterinary Biomedical Sciences,

†Department of Clinical Sciences, and

§Department of Pathology and Microbiology, Faculté de Médecine
Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe (Quebec) J2S 7C6

‡Western College of Veterinary Medicine, University of
Saskatchewan, Saskatoon (Saskatchewan) S7N 5B4

Running title head: Visceral pain assessment in dairy cow

3.1.1 Contexte de la recherche

Le manque de données de validation de l'utilisation des mesures pour la douleur est une véritable problématique pour faire un choix adéquat de méthodes de mesure de la douleur en recherche et en clinique. À ce jour, les stratégies de validité de la mesure suivent celles définies par la théorie classique de la mesure. À l'inverse, l'approche moderne de la psychométrie, suggère une continuité de l'étude de la validité l'utilisation des mesures de la douleur en interprétant les résultats des mesures en fonction des populations et des conditions pour lesquelles la mesure a été faite. Aucune étude à ce jour n'a tenté de mesurer la douleur en utilisant différents instruments de mesure dans des contextes et des populations différentes en vue d'étudier la fiabilité et la validité de l'utilisation de ces mesures pour ces différentes conditions.

Selon le postulat de départ du programme, la perception douloureuse est la même pour des espèces différentes et les animaux ont en commun une définition unique de la douleur. Différents modèles sans lien apparent entre eux ont été choisis pour évaluer la validité des mesures dans des populations et contextes différents.

En étude préliminaire, le modèle viscéral bovin a été choisi pour établir les bases de la recherche de validation des mesures de la douleur chez l'animal. Le bovin est une espèce intéressante car les mesures ponctuelles de stress, de l'activité sympathique et les changements descriptifs de comportement sont usuellement utilisés et très bien décrits chez le veau dans des conditions standardisées. Ces mesures sont dominantes particulièrement dans des modèles aigus de douleur. En revanche, d'autres mesures non jamais été évaluées sur ce modèle (changements neurophysiologiques,

comportement spécifiques), ce qui fait que les mesures sont exploratoires et devront être confirmées.

L'objectif initial était 1) d'évaluer la fiabilité et la validité des mesures (validation de construit) sur un modèle viscéral bovin. En comparant les groupes de traitement entre eux et sur la base d'une hypothèse de modulation de la douleur par palier et en prenant en compte des caractéristiques du modèle, cette première étude avait pour objectif secondaire de faire un tri préliminaire des méthodes dont la mesure était valide pour les conditions de cette étude.

Pour cette étude, des mesures usuelles (EVA, cortisolémie plasmatique) et des mesures non usuelles (vidéo-analyse, activité motrice par bio-télémetrie, dosage de bio-marqueurs contenus dans le liquide cébrospinal, mesure de la sensibilisation, échelle de douleur développée pour le modèle) sont utilisées pour étudier la douleur chez la vache. Ces méthodes permettaient d'investiguer les voies physiologiques de la nociception, la mesure de la douleur avec l'utilisation d'une échelle construite à cette occasion, l'adaptation comportementale suivant la mise en place de la pince, une réponse physiologique de stress. La validité reposait sur la capacité des mesures à différencier les groupes de traitement répartis selon différentes conditions analgésiques. L'hypothèse est que les vaches ayant une analgésie multimodale présentaient moins de signes de douleur par comparaison aux vaches ayant une analgésie modérée, alors que les vaches ayant une faible analgésie présentaient des signes prononcés de douleur.

3.1.2 Résumé de l'article

La douleur chez les bovins est mal connue. L'objectif de cette étude pilote réalisée en conditions expérimentales était d'identifier les méthodes de mesure valides à la présence de douleur chez la vache sur une période de 21 jours. Cette étude prospective, en aveugle, randomisée et contrôlée permettait d'examiner la capacité des méthodes à différencier trois intensités de douleur sur un modèle de douleur chronique d'origine viscérale (réticulo-péritonite traumatique) chez la vache, lorsque la douleur était modulée par trois qualités analgésiques (groupe #1 traité à l'aspirine, n=4 ; groupe #2 traité avec une analgésie unimodale et préventive à base d'acide tolfénamique, n=5 ; groupe #3 traité avec une analgésie multimodale et préventive à base de morphine épidurale, ainsi qu'acide tolfénamique et butorphanol, n=3). L'évaluation de la douleur s'est réalisée à l'aide de mesures neurophysiologiques (dosage de bio-marqueurs contenus dans le liquide cébrospinal, et mesure de la sensibilisation), comportementales (vidéo-analyse, activité motrice par bio-télémetrie), physiologiques (AED), endocriniennes (cortisol plasmatique) et des mesures des scores de douleur (échelle de douleur standardisée, et EVA). La validité dépendait de la convergence des méthodes à mesurer les trois sévérités attendues de douleur viscérale. Une analgésie de secours était administrée dès qu'estimée nécessaire. Des équations d'estimation généralisées ont testé les différences entre les groupes ainsi que l'influence de l'analgésie de secours sur les mesures.

À 21 jours, les vaches en douleur (groupe #1) démontraient une plus grande sensibilité mécanique par rapport aux vaches sous analgésie préventive unimodale (groupe #2) et multimodale (groupe #3). Également, une protéine de 15 KDa nommée transthyrétine était sous régulée de façon concomitante à la sensibilisation mécanique des vaches en douleur. De plus,

dans le groupe #1, la noradrénaline cérébrospinale a diminué sur le long-terme. Les vaches en douleur étaient hypersensibles à la stimulation mécanique, et aussi diminuaient en activité motrice tout en exprimant des signes d'agitation (indicateur de douleur) visibles à l'aide de l'activité motrice et de la vidéo-analyse (critère 'agitation lorsque couchée'). Des critères diminués tels que le 'comportement alimentaire', les échelles de douleur rapportées par l'observateur, l'AED et la concentration plasmatique de cortisol se sont révélées capables, de manière ponctuelle, à différencier l'intensité douloureuse entre les groupes.

Les résultats supportaient la présence de douleur centralisée chez les bovins, marquée par l'émergence d'un bio-marqueur cérébrospinal, et la sensibilisation centrale mécanique. Surtout cette douleur était concomitante à une diminution de l'activité et l'apparition d'agitation.

Synthèse – Notre étude ouvre de nouveaux axes de recherche dans l'étude de la douleur chez les bovins, pour lesquels jusqu'à ce jour, la douleur était surtout étudiée sous l'angle comportemental et par la mesure de marqueurs de stress. Nous confirmons que le changement de comportement est relativement frustré par comparaison à l'ensemble des comportements analysés. Cependant, l'identification de la douleur centralisée a permis de mieux comprendre ces changements comportementaux et physiologiques.

Cette étude pilote ouvre la voie vers une optimisation du choix des méthodes de mesure pour l'étude de la douleur centrale chez le bovin, notamment en douleur chronique, et vers de nouvelles approches dans de mesure de la douleur pour laquelle la transthyrétine semblerait un marqueur d'intérêt. Surtout cette étude chez la vache a permis de faire un premier tri de méthodes les plus prometteuses pour l'étude de la douleur et, possiblement,

d'identifier les meilleures méthodes pour l'étude de la douleur de l'animal en général.

3.1.3 Interpretive summary – Visceral pain assessment in dairy cow

The concept of food animal pain and welfare has gained worldwide importance to society and healthcare professionals. The lack of routine pain evaluation is partly explained by the lack of validity of behavioral and physiological changes in measuring pain, specifically chronic pain. This study looked at visceral pain in cows, particularly at the central sensitization process, playing a major role in pain perception / modulation. The neurological changes linked to centralized pain were more objective and predictable in the level of pain intensity. This research opens avenues to develop objective methods in cattle pain quantification.

3.1.4 Abstract

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

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

Key Words: Pain metrology, animal behavior, central sensitization, pre-emptive multimodal analgesia.

3.1.5 Introduction

Visceral pain is considered one of the most painful clinical conditions in adult cattle (Huxley and Whay, 2006; Laven et al., 2009). In addition, knowledge relevant to chronic pain mechanisms is lacking in dairy cattle (Walker et al., 2011). It is very difficult to develop new analgesic treatments for cows in the absence of a validated method of pain assessment that

integrates the basic scientific knowledge of central pain mechanisms in this species. The overall challenge is therefore to investigate which pain mechanism(s) is(are) associated with a specific clinical condition, and in particular to relate it(them) to signs and pain symptoms in cattle. This is even more crucial for visceral pain, such as that caused by traumatic reticuloperitonitis (TRP). The signs of naturally occurring TRP disease are consistent with localized peritonitis and include anorexia, fever, tachypnea, and an arched stance with abducted elbows (indicating cranial abdominal pain). Acute and chronic TRP has never been investigated, to the best of our knowledge, in a bovine pain study. Therefore, this study represents an original opportunity to establish the validity of usual methods of bovine pain assessment in this specific visceral pain model.

Pain evaluation in cattle has generally been studied in the context of routine livestock husbandry and surgical procedures and clinical disease states. For example, husbandry procedures (Molony et al., 1995; Stafford and Mellor, 2005), orthopedic lameness (Huxley and Whay, 2006; Laven et al., 2009), inflammatory diseases (Kemp et al., 2008; Rasmussen et al., 2011), and abdominal procedures (Mialon et al., 2012) induce pain of variable intensity. Accordingly, physiologic measures related to the sympathetic system, such as hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity (reflected by heart rate as well as plasma cortisol and catecholamine alterations), behavioral (spontaneous and nocifensive) responses, and general bodily functions (such as food intake, weight gain, milk balance, or energy balance) have been used to assess pain in cattle. In general, only the methods comprising dosage of cortisol and objective measurements of behavioral changes have led to the approval of analgesic drugs in cattle, such as lidocaine, xylazine, and many nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID).

Therefore, determination of the clinical validity of these models has largely been based on the pharmacological responsiveness of the aforementioned analgesic drugs (Stafford and Mellor, 2005; Baldrige et al., 2011). Nevertheless, stress and handling of cattle might be major confounding factors in the evaluation of pain and analgesic responses (Stilwell et al., 2010; Baldrige et al., 2011; Mialon et al., 2012), thus decreasing the ability to detect pain, and in consequence the real efficacy of the tested analgesic. Indeed, the interpretation of bovine physiologic and behavioral changes in terms of the individual animal's pain experience is therefore far from straightforward.

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

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

3.1.6 Materials and methods

3.1.6.1 Animals

All procedures involving the use of animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (RECH-1261), and were consistent with the Canadian Council on Animal Care guidelines for animals’

healthcare and management (Olfert et al., 1993). Twelve healthy, lactating Holstein cows [mean (SD)] averaging 4.8 (1.5) yr of age and weighing 654 (79) kg were selected from the internal livestock of the Faculty of Veterinary Medicine (FMV; Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada) and from surrounding private farms. All cows underwent a thorough clinical examination and serum biochemical and hematological analyses to rule out lameness, mastitis, and the presence of either noninflammatory or inflammatory disease. They were also assessed for pain using a VAS (Laven et al., 2009). The cows underwent an acclimation period of 3 wk before the study at the FMV. They were housed in individual tiestalls (neck-bar ties) on dry straw bedding that was changed daily. Room temperature was 23.4 (4.0)°C and air changes were not controlled. The cows were fed hay ad libitum and a concentrate mix (Synchro 6000 dairy ration 16%, Co-Op, Montreal, QC, Canada) 3 times a day. The amount of concentrate to be fed to each lactating cow was calculated based on BW (Conseil-Lait software 1996, Valacta, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) and did not exceed 6 kg/d. Water was supplied ad libitum. The cows were milked twice daily (at 0530 and at 160 h). Clinical evaluations were performed daily, at the time of milking.

3.1.6.2 Study Design

The design was a 2-phase study comprising a 21-d baseline period (measurements at d -21, d -15, and d -7) followed by surgically induced TRP pain on d 0 at h 0, followed by a 21-d period of visceral pain follow-up (Figure 1). Data recorded at d -7 were used as baseline values. The CSF sampling, MPT, accelerometry, video analysis, pain scales (VAS, VPS, TPS), EDA, and plasma cortisol were recorded according to the timeframe (Figure

1). For CSF biomarkers and MPT, data from d 1 to 8 were pooled to maximize the power of the analysis in a pilot study and thereafter noted as d 1–8. Accelerometer and video analysis were continuously recorded and analyzed over 2 h on each day of recording. All observers were blinded to group assignment.

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

3.1.6.3 Surgically Induced TRP

A standardized rumenotomy was performed via a left flank laparotomy in standing, nonsedated cows. Local anesthesia was achieved with a proximal paravertebral block using 60 to 80 mL of lidocaine

(Vetoquinol Canada Inc.). After rumen incision, the gastric compartments were explored for the presence of foreign bodies. A 10-cm-diameter stainless steel circular claw was inserted into the muscularis tissue of the antero-medial wall of the reticulum, without perforation. Surgery ended after a step-by-step process of cleaning and placing rumenal, peritoneum, muscle, and skin sutures. Postoperative care included daily disinfection of the wound for 6 to 8 d, a light diet for 2 to 3 d, and removal of skin sutures on d 7. The circular claw remained in place for 21 d. The cows were then euthanized with 40 mg/kg intravenous sodium pentobarbital (Bimeda-MTC Animal Health Inc.) and claw implantation was verified by postmortem examination.

3.1.6.4 Rescue Analgesia

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

3.1.6.5 CSF Biomarkers

Approximately 5 mL of CSF was sampled following lumbar puncture performed with an 18-gauge × 70-mm needle attached to a 10-mL syringe. Any CSF sampling with trace blood was discarded and not analyzed further.

The CSF collected was transferred into 3 prechilled tubes (Vacutainer, Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ) and stored at -80°C until assayed.

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

Protein identification was performed by HPLC-MS. The observed ions (m/z) were surveyed using the MASCOT search engine (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) and data obtained were validated using mMASS 5.0 (Strohalm et al., 2008). In silico collision-induced dissociation (CID) spectra were generated with mMASS 5.0 and compared with CID spectra generated with a HPLC-tandem MS (MS/MS) system. The HPLC-MS/MS system comprised a Thermo Surveyor HPLC system and a Thermo Advantage quadrupole ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (Thermo Scientific). Identification was based on a previous published method (Steen and Mann, 2004).

For protein quantification, 15-kDa proteins on the SDS-PAGE gel were visualized with an imaging system equipped with a cooled charge-coupled device (CCD) camera (Chemi genius2, Syngene; PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). Semiquantitative analysis was performed by densitometry using GeneTools software by Syngene (PerkinElmer). Protein

quantity was evaluated relative to the baseline CSF band density for each bovine sample.

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

3.1.6.6 Mechanical Pain Threshold (MPT)

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

3.1.6.7 Spontaneous Behavioural Measurements

Accelerometry. The accelerometer is an automated device (Actical; Mini Mitter, Bio-Lynx Scientific Equipment, Montreal, QC, Canada) with a bidirectional microchip that quantifies motor activity (MA). Accelerometer recording has been shown to be reliable and valid recording of activity in dairy cows (Müller and Schrader, 2003; 2005) and was responsive to NSAID in calves following dehorning (Theurer et al., 2012). The Actical accelerometer is sensitive to movements in the range of 0.35 to 3.5 Hz. Each device was attached to a halter at the level of the cow's neck and in line with the vertebral axis from d -21 to d 21. The accelerometer was initialized using 15-s epochs, so that a total number of 5,760 values of MA (unitless) were registered at each time point (from 08:00:00 to 07:59:4 h) for each cow. The average of the 5,760 daily MA recordings was examined for the subsequent analysis.

Automated Video-Analysis. Automated video recording was performed using a webcam camera positioned in front of the cows. For every cow, fourteen 5-min samples were recorded at 0800, 0900, 1200, 1300, 1400, 1500, 2000, 2100, 2200, 0200, 0300, 0400, 0600, and 070 h per day of evaluation. An ethogram was constructed based on data from the literature (Krohn and Munksgaard, 1993; Krohn, 1994; Fogsgaard et al., 2012) and our own experience (Table I). Behavior occurrence was quantified by one blinded observer using analysis software (The Observer version 3.0; Noldus, Tracksys Ltd., Nottingham, UK). Briefly, a count of 1 was assigned each time an event of a coded behavior occurred (frequency) throughout a total time of 70 min per 2 h. The counts of each behavior were summed and used for further analysis.

3.1.6.8 Observer-Reported Pain Measures

One observer assessed the cow's pain using the VAS, a 100-mm horizontal line ranging from 0 (no pain) to 100 (most severe pain), and the VPS, a composite pain scale, which ranged from 0 (no pain) to 25 (severe pain), (Appendix 1). A second observer completed the TPS, which comprised 8 dichotomous items (presence = 1 or absence = 0; Appendix 2); thus, TPS scores ranged from 0 (no pain) to 8 (severe pain).

3.1.6.9 Physiological and Pathological Measurements

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

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

3.1.6.10 Data and Statistical Analyses

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

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

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

comparisons of interest). Thus, significant P-values were $0.05/21 = 0.0023$ for CSF biomarkers, MPT, and cortisol, $0.05/27 = 0.0018$ for MA and video analysis, and $0.05/24 = 0.002$ for VAS, VPS, TPS, and EDA.

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

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

3.1.7 Results

3.1.7.1 Rescue Analgesia

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

3.1.7.2 CSF Biomarkers

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

CSF Proteomics. For CSF TTR concentration, the GEE model analysis indicated significant effects for fixed factors (Table II). In group 1, relative to d -7, the RR of decreased CSF TTR was 1.23 (95% CI = 1.09 to 1.37; P = 0.003) and 1.58 (95% CI = 1.36 to 1.84; P < 0.001) at d 15 and 21, respectively (Figure 4A). Group 2 cows had 1.14 (95% CI = 1.07 to 1.20; P = 0.0003) times less TTR at d 21 relative to d -7. Group 3 cows had 1.29 (95% CI = 1.09 to 1.52; P = 0.002) times less TTR at d 1–8 compared with that at d -7, but the other time points did not differ from d -7. For the intergroup comparison, at d 1–8, group 1 cows had 1.44 (95% CI = 1.19 to 1.75; P < 0.001) times more TTR than those in group 3 (Figure 4A). Interestingly, at d 21, group had 1.39 (95% CI = 1.18 to 1.63; P < 0.001) and 1.82 (95% CI =

1.50 to 2.19; $P < 0.001$) times less TTR than group 2 and group 3, respectively. In addition, group 2 had 1.30 (95% CI = 1.10 to 1.53; $P = 0.001$) times less TTR relative to group 3 at d 21 (Figure 4A). We observed an inverse relationship between the CSF concentration of TTR and the pain hypersensitivity (see below) in this cattle pain model.

CSF Catecholamine. For CSF noradrenaline, the GEE model analysis indicated a significant effect for fixed factors, but an absence of group effect (Table II). In group 1, relative to d -7, the RR of decreased concentration of CSF noradrenaline was 1.24 (95% CI = 1.09 to 1.41; $P = 0.0007$) and 1.17 (95% CI = 1.07 to 1.29; $P = 0.0004$) at d 15 and 21, respectively (Figure 4B). Relative to d -7, CSF noradrenaline did not change with time in groups 2 ($P = 0.61$ at d 1-8, $P = 0.91$ at d 15, and $P = 0.84$ at d 21) and 3 ($P = 0.25$ at d 1-8, $P = 0.52$ at d 15, and $P = 0.36$ at d 21). We observed no significant difference between groups for CSF noradrenaline at any time point.

3.1.7.3 MPT Sensitivity

The reference threshold for sensitivity to MPT was 11.9 N at d -7. The number of nonsensitive leg(s) was equally distributed in each group at baseline (d -7). For the number of nonsensitive legs, fixed effects were significant in the GEE model analysis (Table II). Group 1 was 3.39 (95% CI = 1.91 to 6.02; $P < 0.001$) and 3.11 (95% CI = 1.89 to 5.18; $P < 0.001$) times more likely to develop hypersensitivity (a decrease in the number of nonsensitive legs) at d 15 and 21 relative to d -7, respectively (Figure 4C). We found no significant change with time for groups 2 and 3. At both d 15 and 21, group 1 cows were hypersensitive compared with group 2 (RR = 5.71, 95% CI = 2.54 to 8.29; $P < 0.001$, and RR = 4.67, 95% CI = 3.33 to

6.57; $P < 0.001$, respectively) and group 3 (RR = 5.18, 95% CI = 3.62 to 7.26; $P < 0.001$, and RR = 4.75, 95% CI = 3.68 to 6.11; $P < 0.001$, respectively; (Figure 4C).

3.1.7.4 Spontaneous Behavioral Measurements

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

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

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

The occurrence rate of “feeding behavior” significantly increased at d 2 relative to d -7 in group 3 ($P = 0.0006$; Figure 5C). At d 2, the RR of “feeding behavior” in group 2 was 5.62 (95% CI = 2.52 to 12.59; $P < 0.001$) and in group 3, 4.16 (95% CI = 2.64 to 6.57; $P < 0.001$) times higher relative to group 1 (Figure 5C).

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

In group 1, the occurrence rate of “head high/turned” significantly decreased at d 0 compared with d -7 ($P = 0.0002$) and decreased in group 3 at d 2 compared with d -7 ($P < 0.001$; Figure 5E). At d 2, the RR in group 2 of “head high/turned” was 3.03 (95% CI = 2.26 to 4.06; $P < 0.001$) times more relative to group 3 (Figure 5E).

3.1.7.5 Observer-Reported Pain Measures

Results of the GEE models are shown in Table II. For VAS, at d 2, the RR of increased VAS score in group 1 was 2.15 (95% CI = 1.34 to 3.45; $P = 0.0015$) times more relative to group 2 (Figure 6). We observed no significant difference between groups for the other time comparison for VAS, VPS, and TPS (data not shown).

Cronbach's coefficient α , calculated as an exploratory analysis, was 0.67 for the VPS. The poor correlation between the VPS total score and the following physiological items: VPS-T ($r = 0.19$), VPS-HR ($r = 0.10$), and VPS-RR ($r = 0.12$) indicated that these items were not concordant with the VPS score (see Appendix 1 for definitions). The remaining items: VPS-BP ($r = 0.27$), VPS-A ($r = 0.54$), VPS-WP ($r = 0.30$), VPS-App ($r = 0.60$), VPS-Face ($r = 0.59$), and VPS-Post ($r = 0.55$) had acceptable correlations with the VPS score, showing that these items were homogeneous. For the TPS, Cronbach's coefficient α was 0.71 and correlations of each item with the total score showed that the items were concordant with the total score ($0.21 < r < 0.70$).

3.1.7.6 Physiological and Pathological Measurements

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

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

At d -7, plasma cortisol concentrations (median and IQR) were not different between groups 1 [22.45 (14.70–31.95) nmol/L], 2 [21.90 (14.70–31.95) nmol/L], and 3 [21.80 (16.60–27.20) nmol/L]. The concentration of

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

Daily observation of cattle showed a huge decrease in feed intake (as mentioned in the video analysis section with a between-groups difference) and decreased qualitative (both protein and fat) and quantitative milk production; significant signaling of inflammation (hematological analyses including circulating leucocyte and neutrophil counts, fibrinogen, and total plasma protein) was also observed (data not shown), with few statistically significant differences between groups. Autopsy confirmed local inflammation with fibrin, reticular abscesses, and lack of reticulum perforation in all cows, to the same extent (reticular abscesses, extended inflammation, fibrin, necrosis around the foreign body and skin incision, moderate signs of peritonitis). The extent of tissue lesions was similar among cows and it was impossible to know whether lesions induced the same level of pain severity.

3.1.8 Discussion

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

mechanisms and corresponding behavioral evaluation in the assessment of bovine pain in clinical trials. The present study also underlines the potential application of a potent pain biomarker, TTR, in assessing chronic pain.

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

This experimental chronic pain study showed a long-lasting decrease in CSF TTR and noradrenaline release, as well as the presence of mechanical hypersensitivity in group 1. This indicates activation of centralized pain mechanisms. In addition, the change in MPT and CSF TTR, as observed in

group 1, was suppressed (almost totally) by preemptive multimodal analgesia in group 3. Taken together, these findings suggest that the activity of the descending inhibitory pain control and a concomitant increase of TTR in the dorsal horn of the spinal cord in the visceral pain state might be related to the antihyperalgesic effects of preemptive multimodal analgesia.

In this report, proteomic analysis allowed identification of TTR. This 55-kDa protein is composed of 4 identical subunits of approximately 14 kDa each, synthesized predominantly in cells of the choroid plexus and liver and secreted into the CSF or plasma, respectively (Schreiber, 2002). The role of TTR is recognized mainly in the transport of thyroxin (Monaco, 2000; Power et al., 2000), in neuroprotection (Santos et al., 2010), and in degenerative and chronic diseases in human adults (Richardson, 2007). Interestingly, TTR has been reported in pain studies to be decreased in rat spinal cord after injury (Afjehi-Sadat et al., 2010) and in blood following herniotomy surgery in human patients (Fricova et al., 2010). Previously, TTR was identified in human serum as an inhibitor of constitutive IL-1 β production by human endothelial cells, and it also inhibited LPS-induced IL-1 β production by various cell types (Borish et al., 1992). Interleukin-1 β is known to play a central role in many inflammatory processes. In addition, IL-1 β is implicated in spinal cord central sensitization (Milligan and Watkins, 2009). Probably, TTR functions by inhibiting the processing of newly synthesized peptides for secretion and thus may act as an endogenous antiinflammatory mediator. It has also been demonstrated that TTR knockout mice, compared with wild-type mice, show a 2-fold increase in CSF neuropeptide Y and even more in the brain (hippocampus) and the dorsal root ganglion of the sciatic nerve (associated with a 1.5-fold increase in substance P; Nunes et al., 2006). Both excitatory neuropeptides are involved in pain transmission and modulation. In

the current study, TTR was able to differentiate between groups at d 21, supporting the original hypothesis. In addition, we showed that at d 1–8, TTR decreased in group 3, but increased in group 1, and, at d 21, TTR decreased in group 1. This finding supports that neuronal plasticity exists in the process of CSF TTR release caused by the pain model, where we could hypothesize that TTR counteracts the increased release of inflammatory cytokines and excitatory neurotransmitters. With time, we could propose hypothetically their sustained release to be associated with a high degree of TTR “consumption” as buffer, leading to decreased TTR expression in chronic pain.

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

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

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

Allodynia associated with mechanical sensitivity due to underlying centralized pain was assessed with MPT. Both a stress response (Herskin et al., 2004) and decreased reactivity associated with stoic behavior (Rasmussen et al., 2011) were previously reported in dairy cows with mastitis and might confound the sensitization–pain relationship. For this reason, mechanical pain tests were repeated at multiple sites on each leg, and in the absence of a human experimenter, controlling for effects of variations in sensitivity of different sites on a single limb and for handling stress. A delayed and long-lasting mechanical hypersensitivity was shown in group 1, which confirmed central sensitization in cattle and validated some sensitivity of this method. We found no obvious difference in mechanical sensitivity between groups 2 and 3, suggesting that the responsiveness of this test to different pain

intensities could be limited. Interestingly, a clear protective and long-lasting antihyperalgesic effect of preemptive tolfenamic acid was observed in group 2 cows at d 21, whereas in group 1 cows, RA consisting mainly of tolfenamic acid did not produce hyposensitivity at that time point. This latter finding is in accordance with previous studies in which ketoprofen use had no effect on mechanical sensitization in clinically lame cows (Whay et al., 1998; Laven et al., 2008). Therefore, the finding of reduced responsiveness to an NSAID when central sensitization is already established supports this assessment method. These current findings emphasize the need for other therapeutic pain management strategies for cattle in pathological pain states, such as centrally acting analgesic drugs (Malreddy et al., 2013).

The pain model affected MA, but group 1 cows were more active than cows in both analgesic groups following pain induction. This is in line with a previous study demonstrating decreased activity in meloxicam-treated cows following dehorning (Heinrich et al., 2010), and higher MA after acute abdominal pain compared with healthy cows (Edwards and Tozer, 2004). The decrease in MA was present in all 3 groups (compared with d -7) and this decrease was responsive (less marked) to preemptive analgesics at d 2 (difference between groups 2 and 3). The interference of subsequent RA made the interpretation of MA data difficult. Importantly, automated video analysis showed early (d 2) dramatic and temporary changes: Group 1 cows had more “agitation while lying,” fewer “feeding behavior” events, and fewer “head low/forward” events compared with group 3. These results provide strong evidence of discomfort in group 1 cows, as previously observed in cattle (Edwards and Tozer, 2004; White et al., 2008). Group 1 cows showed more “agitation while lying” from d 2 to 19, which suggested progressive and long-lasting discomfort. Indeed, the best sensitivity and specificity was

achieved with the behavior “agitation while lying” for both acute and chronic pain. In contrast, differences were not detected between groups for the spontaneous behavior “lying down.” Daily lying time recorded via accelerometer (Newby et al., 2013) did not differentiate ketoprofen-treated cows from a placebo group. Altogether, postural change might not be sensitive to pain. “Feeding behavior” was more frequent in both preemptive analgesic groups relative to group 1 at d 2. Recently, surgical treatment of a displaced abomasum in cows treated with ketoprofen apparently improved their feeding behavior compared with that of placebo-treated cows (Newby et al., 2013). Although feeding behavior is seemingly important in assessing pain, some limitations were shown because of the large individual variability at d 2 and the lack of specificity for pain. Moreover, because feeding behavior has been demonstrated to be altered in myriad conditions affecting cows (Urton et al., 2005; Huzzey et al., 2007; González et al., 2008; Fogsgaard et al., 2012), this behavioral criterion is unlikely to be sensitive and specific for assessing chronic pain. In contrast to a previous study (Mialon et al., 2012), group 1 cows had fewer “head low/forward” behaviors, whereas group 3 cows had more “head low/forward” and fewer “head high/turned” behaviors. Interpretation of the cow’s head position alone is not sufficient because both head and ear position may indicate interest in the environment and may reflect alert behavior. In addition, sedative side effects of the drugs were suggested both by the head positions and the long-lasting decrease in MA, as previously observed in another species (Rialland et al., 2012).

In this study, for the observer-reported pain scores, the best sensitivity was demonstrated with VAS because it was the only measure that differentiated between groups at d 2. Neither the VPS nor the TPS

demonstrated good psychometric (internal consistency and sensitivity) qualities. Thus, validation of the bovine pain scales (VPS and TPS) was not achieved in this study. In particular, for the VPS, scores for the physiological items were poorly correlated with the overall VPS score. Therefore, the physiological items should be discarded in a potential future version of this pain scale.

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

One limitation of the current study is that pain symptoms may be confounded with sickness behaviors of TRP, particularly decreased feeding behavior. Because of the pilot nature of this study, interpretation of pain symptoms must be considered in light of specific environmental conditions and disease pathophysiology. Therefore, it would be judicious to repeat the assessments under other housing conditions (e.g., in freestalls) and under different physiological states of the dairy cows. The main limitation of this

model was the small sample size. To keep sufficient power for analysis, both the pain biomarkers and MPT measurements were averaged during the first 8-d period. This statistical method might have decreased the sensitivity of the assessment methods used during acute pain. However, it was the only method that permitted comparisons between pain biomarker levels and MPT tests, which was important in regard to the exploratory nature of studying these 2 promising pain assessment methods. The discovery of a specific and sensitive proteomic biomarker will require confirmation in other species and other pain models before innovative methods to track the neuroproteomic changes can be developed.

3.1.9 Conclusions

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

3.1.10 Acknowledgments

The authors thank the Natural Science and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (#327158-2008), the Canada Foundation for Innovation Ongoing New Opportunities Fund Grant (#9483), and

Vetoquinol S.A. (France) for their fellowships supporting the present work. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Éric Laflamme, Valerie Morin, Normand Lacasse, Guy Beauchamp, and Yaseid El Said (FMV, Université de Montréal, QC, Canada). A kind thought is addressed in memoriam to Jacques de Champlain and his laboratory team (Institut de recherches cliniques de Montréal and Department of Physiology, Université de Montréal, QC, Canada) for their support in all conducted bio-analyses.

3.1.11 References

- Afjehi-Sadat, L., M. Brejnikow, S. U. Kang, V. Vishwanath, N. Walder, K. Herkner, H. Redl, and G. Lubec. 2010. Differential protein levels and post-translational modifications in spinal cord injury of the rat. *J Proteome Res* 9(3):1591-1597.
- Baldridge SL, Coetzee JF, Dritz SS, Reinbold JB, Gehring R, Havel J, Kukanich B (2011). Pharmacokinetics and physiologic effects of intramuscularly administered xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride-butorphanol tartrate alone or in combination with orally administered sodium salicylate on biomarkers of pain in Holstein calves following castration and dehorning. *Am J Vet Res* 72(10): 1305-1317.
- Bergamasco L, Coetzee JF, Gehring R, Murray L, Song T, Mosher RA (2011). Effect of intravenous sodium salicylate administration prior to castration on plasma cortisol and electroencephalography parameters in calves. *J Vet Pharmacol Ther* 34(6): 565-576.
- Borish L, King MS, Mascali JJ, Johnson S, Coll B, Rosenwasser LJ (1992). Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation*. 16(5): 471-484.

- Carbone L (2011). Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives. *PLoS One* 6(9): e21578.
- Chambers JP, Waterman AE, Livingston A (1994). Further development of equipment to measure nociceptive thresholds in large animals. *Vet Anaesth Analg* 21(2): 66-72.
- Cui Y, Xu J, Dai R, He L (2012). The interface between inhibition of descending noradrenergic pain control pathways and negative affects in post-traumatic pain patients. *Ups J Med Sci* 117(3): 293-299.
- de Champlain J, Karas M, Assouline L, Nadeau R, LeBlanc AR, Dubé B, Larochelle P (2007). Effects of Valsartan or Amlodipine Alone or in Combination on Plasma Catecholamine Levels at Rest and During Standing in Hypertensive Patients. *J Clin Hypertens* 9(3): 168-178.
- Edwards JL, Tozer PR (2004). Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders. *J Dairy Sci* 87(2): 524-531.
- Fiebich BL, Candelario-Jalil E, Mantovani M, Heinzmann M, Akundi RS, Hüll M, Knörle R, Schnierle P, Finkenzeller G, Aicher B (2006). Modulation of catecholamine release from rat striatal slices by the fixed combination of aspirin, paracetamol and caffeine. *Pharmacol Res* 53(4): 391-396.
- Fogsgaard KK, Røntved CM, Sørensen P, Herskin MS (2012). Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 95(2): 630-638.
- Fricova J, Vejrazka M, Stopka P, Krizova J, Belacek J, Rokyta R (2010). The influence of pre-emptive analgesia on postoperative analgesia and its objective evaluation. *Arch Med Sci* 6(5): 764-771.
- González LA, Tolkamp BJ, Coffey MP, Ferret A, Kyriazakis I (2008). Changes in feeding behavior as possible indicators for the automatic monitoring of health disorders in dairy cows. *J Dairy Sci* 91(3): 1017-1028.
- Hayashida K-i, Obata H, Nakajima K, Eisenach JC (2008). Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology* 109(6): 1077-1084.

- Heinrich A, Duffield TF, Lissemore KD, Millman ST (2010). The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cauterly dehorning with a local anesthetic. *J Dairy Sci* 93(6): 2450-2457.
- Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J (2004). Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav* 83(3): 411-420.
- Huxley JN, Whay HR (2006). Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *Vet Rec* 159(20): 662-668.
- Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MAG (2007). Parturition behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 90(7): 3220-3233.
- Ingenbleek Y, Young VR (2002). Significance of transthyretin in protein metabolism. *Clin Chem Lab Med* 40(12): 1281-1291.
- Jahn H, Wittke S, Zürlbig P, Raedler TJ, Arlt S, Kellmann M, Mullen W, Eichenlaub M, Mischak H, Wiedemann K (2011). Peptide fingerprinting of alzheimer's disease in cerebrospinal fluid: Identification and prospective evaluation of new synaptic biomarkers. *PLoS One* 6(10): e26540.
- Kemp MH, Nolan AM, Cripps PJ, Fitzpatrick JL (2008). Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. *Vet Rec* 163(6): 175-179.
- Krohn CC (1994). Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. 3. Grooming, exploration and abnormal-behavior. *Appl Anim Behav Sci* 42: 73-86.
- Krohn CC, Munksgaard L (1993). Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. 2. Lying and lying-down behaviour. *Appl Anim Behav Sci* 37: 1-16.
- Kunz S, Tegeder I, Coste O, Marian C, Pfenninger A, Corvey C, Karas M, Geisslinger G, Niederberger E (2005). Comparative proteomic analysis

- of the rat spinal cord in inflammatory and neuropathic pain models. *Neurosci Lett* 381(3): 289-293.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laven RA, Huxley JN, Whay HR, Stafford KJ (2009). Results of a survey of attitudes of dairy veterinarians in New Zealand regarding painful procedures and conditions in cattle. *N Z Vet J* 57(4): 215-220.
- Laven RA, Lawrence KE, Weston JF, Dowson KR, Stafford KJ (2008). Assessment of the duration of the pain response associated with lameness in dairy cows, and the influence of treatment. *N Z Vet J* 56(5): 210-217.
- Malreddy PR, Coetzee JF, KuKanich B, Gehring R (2013). Pharmacokinetics and milk secretion of gabapentin and meloxicam co-administered orally in Holstein-Friesian cows. *J Vet Pharmacol Ther* 36(1): 14-20.
- Mialon MM, Deiss V, Andanson S, Anglard F, Doreau M, Veissier I (2012). An assessment of the impact of rumenocentesis on pain and stress in cattle and the effect of local anaesthesia. *Vet J* 194(1): 55-59.
- Milligan ED, Watkins LR (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10(1): 23-36.
- Molony V, Kent JE, Robertson IS (1995). Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. *Appl Anim Behav Sci* 46(1-2): 33-48.
- Monaco HL (2000). The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2): 65-72.
- Müller R, Schrader L (2003). A new method to measure behavioural activity levels in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 83(4): 247-258.
- Müller R, Schrader L (2005). Individual consistency of dairy cows' activity in their home pen. *J Dairy Sci* 88(1): 171-175.
- Newby NC, Pearl DL, LeBlanc SJ, Leslie KE, von Keyserlingk MAG, Duffield TF (2013). The effect of administering ketoprofen on the physiology and

- behavior of dairy cows following surgery to correct a left displaced abomasum. *J Dairy Sci* 96(3): 1511-1520.
- Nunes AF, Saraiva MJ, Sousa MM (2006). Transthyretin knockouts are a new mouse model for increased neuropeptide Y. *FASEB J* 20(1): 166-168.
- Olfert, ED, Cross BM., McWilliam AA (1993). Guide to the Care and use of experimental animals. Accessed Aug. 2013.
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf
- Pan W (2001). Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics* 57(1): 120-125.
- Power DM, Elias NP, Richardson SJ, Mendes J, Soares CM, Santos CRA (2000). Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *Gen Comp Endocrinol* 119(3): 241-255.
- Rasmussen D, Fogsgaard K, Rontved C, Klaas I, Herskin M (2011). Changes in thermal nociceptive responses in dairy cows following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet Scand* 53(1): 32.
- Remie R, Zaagsma J (1986). A new technique for the study of vascular presynaptic receptors in freely moving rats. *Am J Physiol* 251(2 Pt 2): H463-467.
- Rialland P, Authier S, Guillot M, Del Castillo JR, Veilleux-Lemieux D, Frank D, Gauvin D, Troncy E (2012). Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: a prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. *PLoS One* 7(11): e49480.
- Richardson SJ (2007). Cell and Molecular Biology of Transthyretin and Thyroid Hormones. *International Review of Cytology*. Kwang WJ, Academic Press. 258: 137-193.
- Richter MB, Woo P, Panayi GS, Trull A, Unger A, Shepherd P (1983). The effects of intravenous pulse methylprednisolone on immunological and inflammatory processes in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 53(1): 51-59.

- Saito K, Kanazawa M, Fukudo S (2002). Colorectal distention induces hippocampal noradrenaline release in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 947(1): 146-149.
- Santos SD, Lambertsen KL, Clausen BH, Akinc A, Alvarez R, Finsen B, Saraiva MJ (2010). CSF transthyretin neuroprotection in a mouse model of brain ischemia. *J Neurochem* 115(6): 1434-1444.
- Schreiber G (2002). The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. *Clin Chem Lab Med*. 40(12): 1200-1210.
- Stafford KJ, Mellor DJ (2005). Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *Vet J* 169(3): 337-349.
- Steen H, Mann M (2004). The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 699-711.
- Stilwell G, Carvalho RC, Carolino N, Lima MS, Broom DM (2010). Effect of hot-iron disbudding on behaviour and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. *Res Vet Sci* 88(1): 188-193.
- Strohalm M, Hassman M, Kořata B, Kодиček M (2008). mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(6): 905-908.
- Theurer ME, White BJ, Coetzee JF, Edwards LN, Mosher RA, Cull CA (2012). Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. *BMC Vet Res* 8(48).
- Tsigos C, Chrousos GP (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53(4): 865-871.
- Urton G, von Keyserlingk MAG, Weary DM (2005). Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 88(8): 2843-2849.
- Walker KA, Duffield TF, Weary DM (2011). Identifying and preventing pain during and after surgery in farm animals. *Appl Anim Behav Sci* 135(3): 259-265.

- Whay HR, Waterman AE, Webster AJ, O'Brien JK (1998). The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *Vet J* 156(1): 23-29.
- White BJ, Coetzee JF, Renter DG, Babcock AH, Thomson DU, Andresen D (2008). Evaluation of two-dimensional accelerometers to monitor behavior of beef calves after castration. *Am J Vet Res* 69(8): 1005-1012.
- Ziegler A, Kastner C, Blettner M (1998). The generalised estimating equations: an annotated bibliography. *Biom J* 40(2): 115-139.

3.1.12 Appendices

Appendix 1 – Veterinarian Pain Scale (VPS) used in this cow study

Veterinary Pain Scale (VPS)

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

* indicate the part of the face that moves

Total score : _____ / 25

Appendix 2 – Technician Pain Scale (TPS) used in this cow study.

| Items | Present | Absent |
|---|----------------------------|----------------------------|
| No approaching food | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| No eating | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| No ruminating | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| Abnormal posture | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| Unusual behavior when close to the observer | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| Fear or avoidance | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| Vocalization or teeth grinding | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| Aggressiveness | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 0 |
| Total score* | _____ | |
| | ___ / 8 | |

* Technician Pain Scale scores ranged from 0 (no pain) to 8 (severe pain)

3.1.13 Tables

Table I - Ethogram of dairy cows behavioral observations (video analysis)

| Behavior | Definition |
|--|---|
| Standing ¹ | The cow stands on all its 4 limbs |
| Lying ¹ | The cow's body is resting in contact with the floor (on the right or left side) |
| Transition ¹ | The cow moves from kneeling to lying down with the body resting in contact with the floor |
| Agitation while lying | While lying down, the cow stretches a leg, steps, kicks or changes position without going from lying to standing or from one side to the other |
| Agitation while standing | While standing, the cow stretches a leg, kicks, or changes weight bearing limb, position, without going from standing to lying |
| Head, high (Forward or turned) ² | The cow's head is at a level just above the shoulder; The cow's neck is either held forward or turned backward |
| Head, low (Forward or turned) ² | The cow's head is below the shoulder or touching the floor; The cow's neck is either held forward or turned backward and rests on her body or the floor |
| Teeth | Grinding the teeth |
| Lips | Licking the lips |
| Lick muzzle | Sweeping the tongue over the upper lip and/or nostril |
| Lick wound | Licking the surgical incision site (left flank) |
| Self-grooming | Rubbing the head or any parts of the body against |

| | |
|---------------------------------------|---|
| | other body parts or stall fixtures, or licking body parts (except the area of the surgical incision site) |
| Feeding behavior | Pushing the muzzle into feed, chewing feed |
| Rumination | Regurgitation, chewing, and swallowing of previously eaten feed |
| Drinking | The cow's muzzle is positioned in the drinking bowl. |
| Idle | The cow is inactive |
| Disturbed by human³ | A human is present in the cow's stall or a neighbouring stall, or the cow is milked or tightly tethered |
| Social interaction | The cow interacts with its neighbour (has her head outside her own stall, or licks or threatens her neighbour). |
| No interest³ | The cow shows no interest in its neighbour |

¹ 'Lying', 'standing', and 'transition' are mutually exclusive.
² Head and neck position choices are mutually exclusive. ³
'Disturbed by human' and 'no interest' are environmental factors.
Each behavior recording takes into account all of: body position¹,
head and neck position² and environmental factors³.

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

| Variables | Time | Group | Interaction of group with time | Rescue analgesia | Group difference at baseline² RR (95% CI) |
|----------------------------------|-------------|--------------|---------------------------------------|-------------------------|---|
| | P | P | P | P | |
| Pain outcomes¹ | | | | | |
| CSF TTR | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | |
| CSF NOR | 0.004 | 0.42 | <.0001 | <.0001 | |
| MPT | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | |
| Accelerometry | <.0001 | 0.007 | <.0001 | <.0001 | Group 1 < Group 3 1.57 (1.18 - 2.08) |
| Agitation while lying | <.0001 | 0.0002 | <.0001 | 0.17 | |
| Feeding behavior | 0.0002 | 0.007 | <.0001 | <.0001 | |
| Head low / forward | <.0001 | 0.50 | <.0001 | <.0001 | |
| Head high / turned | <.0001 | 0.25 | <.0001 | <.0001 | |
| VAS | 0.25 | 0.29 | <.0001 | <.0001 | |
| VPS | <.0001 | 0.21 | <.0001 | <.0001 | |
| TPS | <.0001 | 0.57 | <.0001 | <.0001 | |
| EDA | <.0001 | 0.004 | <.0001 | <.0001 | |
| Plasma cortisol | <.0001 | 0.53 | <.0001 | <.0001 | |

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

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

3.1.14 Figure legends

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

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

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

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

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

which was repeated at h 46; group 3 cows (n = 3) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.

Figure 6 - Visual analog scale (VAS) by group over time. Data are presented as LSM estimates and SE for groups of n = 3 to 5 cows. Time points 0.02 and 0.10 correspond to d 0 at 2 h and 10 h, respectively. At each time point, different letters (a, b) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected α level was 0.002. Results are LSM \pm SE. Group 1 cows (n = 4) were treated with 50 mg/kg of intraruminal acetylsalicylic acid at d 0 (h 1); group 2 cows (n = 5) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid 2 h before surgery on d 0 (h -2), which was repeated at h 46; group 3 cows (n = 3) received an i.m. injection of 2 mg/kg tolfenamic acid at h -2 and h 46 and an epidural injection of morphine sulfate at a dose of 0.1 mg/kg at h -2, which was repeated at h 22 and h 46, and s.c. butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg at h -2.

3.1.15 Figures

Figure 1 - Study design

| Day (d) | -21 | -15 | -7 | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 15 | 19 | 21 |
|----------------------------|-------------------------------|-----|----|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| hour (h) at d0 Timeline | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dairy Cows | ↑ Inclusion ↑ TRP ↑ End | | | | | | | | | | | | | | | |
| Analgesia | ↑ Analgesia ↑ | | | | | | | | | | | | | | | |
| Group 1 | P A P P | | | | | | | | | | | | | | | |
| Group 2 | T P P T | | | | | | | | | | | | | | | |
| Group 3 | T, M, B P M T, M | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pain outcomes | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| CSF TTR, NOR | * | * | * | * | (*) | (*) | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| MPT | * | * | * | * | (*) | (*) | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Accelerometry | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Video-analysis | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| VAS, VPS, TFS | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| EDA | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Plasma cortisol | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

Figure 2

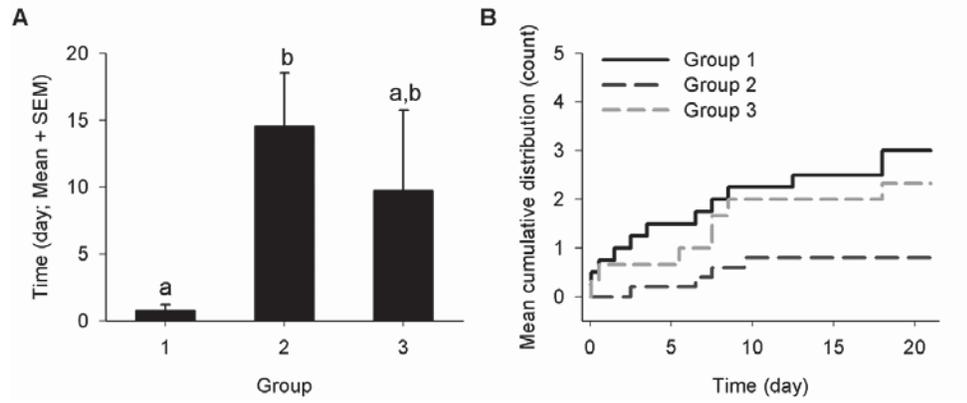


Figure 3

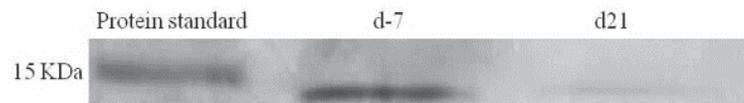


Figure 4

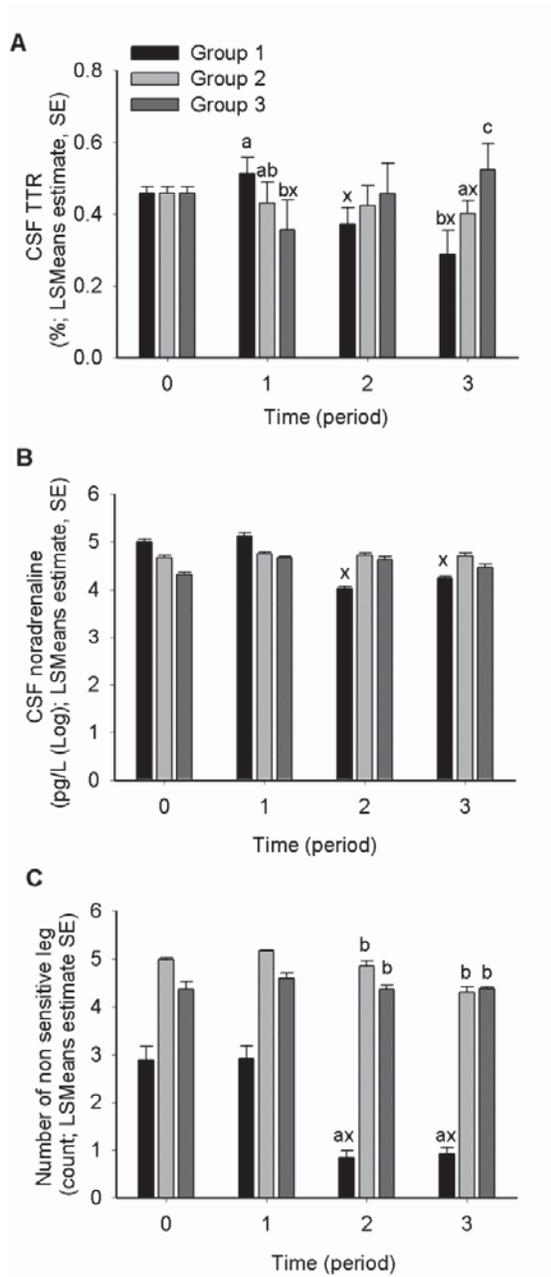


Figure 5

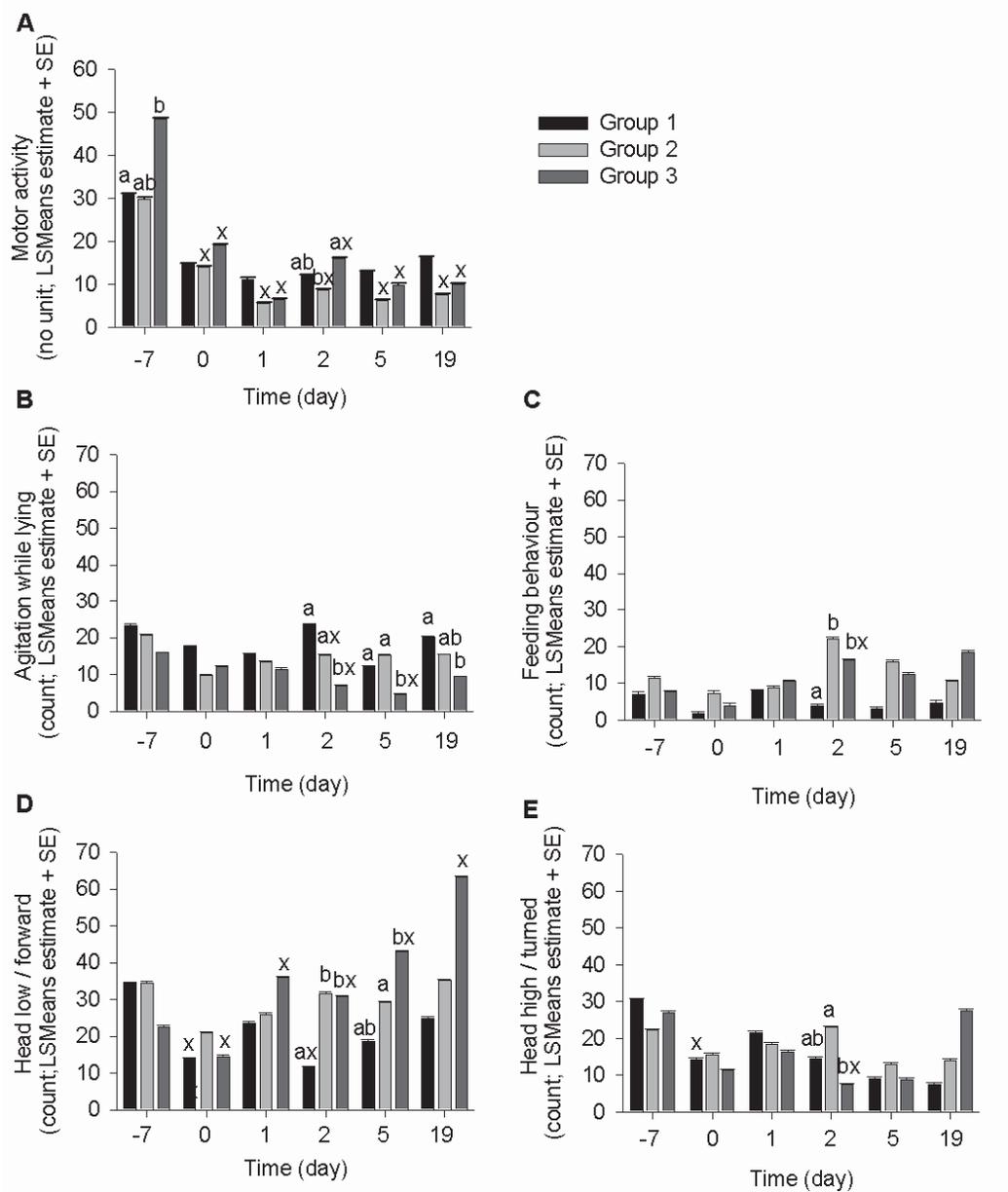
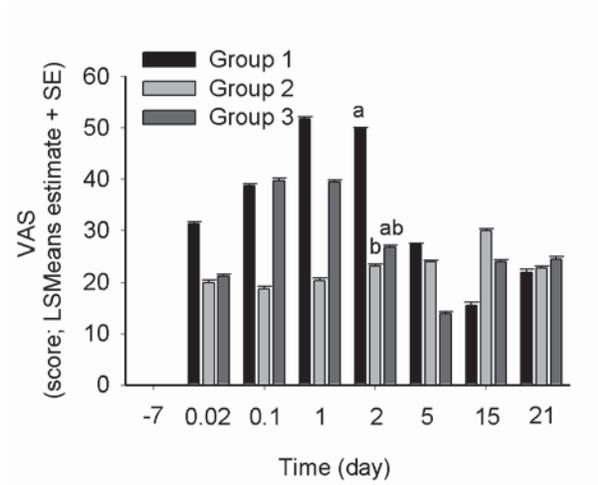


Figure 6



3.1.16 Données additionnelles sur la vidéo-analyse

3.1.16.1 Méthodologie de la construction et de la mesure de fiabilité de l'éthogramme

Le développement de l'éthogramme avait pour but de mesurer les changements de comportements associés à la mise en place de la douleur viscérale chez la vache laitière localisées dans des stalles à l'attache. Une recherche préliminaire de littérature a permis de dresser une liste de comportements chez la vache laitière. Néanmoins, aucune grille ne permettait de mettre en avant les changements de comportements causés par une douleur viscérale. Le processus de sélection des items s'est réalisé en plusieurs étapes selon le processus détaillé ci-dessous.

1. OBSERVATION PRÉLIMINAIRE; Avant la réalisation de l'étude de recherche #1, une étude pilote sur deux vaches a été réalisée pour valider le modèle de douleur viscérale. Au cours de l'étude pilote, un observateur (PR) a listé des comportements observables avant et après la chirurgie chez la vache. Les observations ont été réalisées sur deux périodes de deux heures avant et après la chirurgie (Annexe I).

2. IDENTIFICATION ET DEFINITION DES COMPORTEMENTS D'INTERET POUR L'ÉTUDE DE LA DOULEUR; Les comportements observés étaient classés dans des catégories de comportements indépendants (par exemple dans une même catégorie : Vache couchée ou Vache debout). Un éthogramme de comportements associés à une définition claire du comportement a été listé par l'investigateur principal (PR). La liste initiale de comportements comprenait l'ensemble des comportements normaux identifiés dans la littérature ainsi que la liste de comportements détectés au cours de l'étude pilote. Cette liste de comportements a été classée selon les

catégories (position du corps, hauteur de la tête, position des oreilles, description des mouvements des yeux, description des mouvements du museau, soins corporels, interaction avec les bovins, mobilité, environnement). La liste a été révisée par un pathologiste bovin et un comportementaliste pour détecter les ambiguïtés, les incompréhensions et les incohérences afin de redéfinir si nécessaire les comportements avec clarté et compréhensibilité.

3. CODAGE DES COMPORTEMENTS; Les comportements ont été implémentés dans le logiciel de saisie (The Observer Version 3.0; Noldus, Tracksys Ltd., Nottingham, United Kingdom). Ce premier codage de l'éthogramme a été testé par PR, la comportementaliste (DF) et une observatrice externe (MLdC) qui ne connaissait pas l'étude de recherche. En visualisant des vidéos de vaches exclues de l'étude, l'objectif était de relever les ambiguïtés, les incohérences du codage ou de définitions et d'identifier les difficultés de la mesure. Également, ce premier codage avait pour but de détecter des comportements non listés dans l'éthogramme et de les coder dans l'éthogramme.

4. SIMPLIFICATION DE L'ETHOGRAMME; Une fois le codage admis dans sa forme la plus élaborée, une série de quelques vidéos de vache avec et sans douleur ont été observées de façon aléatoire par la comportementaliste et l'observatrice externe (MLdC) et (PR). Ces mesures ont permis de supprimer le codage des comportements difficiles à observer tels que le clignotement des yeux qui ne se distinguent pas sur une vache avec le cuir noir (mesure codée « non visible » dans les catégories de comportements).

5. TESTER L'ETHOGRAMME EN FONCTION D'UNE HYPOTHÈSE DE DIFFÉRENCE DE COMPORTEMENTS EN PRÉSENCE

OU EN ABSENCE DE DOULEUR; L'observatrice externe (MLdC) était le codeur pour l'ensemble des vidéos de l'étude. Afin de tester la capacité de l'éthogramme à différencier les vaches en présence et l'absence de douleur, le codeur a visualisé « en aveugle » de vidéos des vaches en absence de douleur (avant l'induction de modèle de RPT) et de vidéos après la douleur (vaches appartenant au groupe placebo). Cette analyse exploratoire a permis de lister les différences d'expression de comportements de vaches en douleur et de celles non en douleur codable par l'éthogramme. Ces comportements ont été maintenus dans l'éthogramme (données publiées).

6. ANALYSE DE LA FIABILITÉ; Les enregistrements se faisaient en laboratoire sans discussion entre les observateurs. Les trois observateurs (DF, MLdC et PR) ont visualisé 10% des vidéos disponibles (Martin and Bateson, 2007). Les trois observateurs ont codés les mêmes vidéos de façon aléatoire. Les coefficients de corrélation intraclasse (CCI) permettaient de calculer la fiabilité inter-observateur. La fiabilité du codeur principal (fiabilité intra-observateur) a été analysée sur 10% des vidéos randomisées en cours de mesure (Martin and Bateson, 2007).

3.1.16.2 Résultats et discussion

L'éthogramme préliminaire (Annexe I et revue de littérature de comportements connus chez la vache laitière) se compose de 9 catégories (position du corps, hauteur de la tête, position des oreilles, description des mouvements des yeux, description des mouvements du museau, soins corporels, interaction avec les bovins, mobilité, environnement) (donnée non montrée).

La fiabilité inter-observateur était satisfaisante ($CCI > 0,70$) pour l'ensemble des comportements, à l'exception de 'tête devant haute', 'tête

devant basse', 'oreilles derrière', 'Pas d'interaction', 'museau, mouvement léchage'. La fiabilité intra-observateur était satisfaisante ($CCI > 0,70$) pour l'ensemble des comportements mais la mesure des fréquences des positions des oreilles et des yeux demeuraient peut concordante. Si MLdC avait une concordance intermédiaire entre PR et DF, les niveaux de concordance entre MLdC et PR étaient satisfaisants pour l'ensemble des mesures à l'exception de la mesure des fréquences des oreilles et des yeux. La discussion entre les codeurs a mis en avant la grande difficulté à suivre le mouvement des oreilles des vaches qui est permanente. Également, la visualisation des yeux des bovins étaient difficile à cerner sur des animaux noirs. Ces deux catégories ont été retirées de l'éthogramme et de l'analyse finale par manque de consensus sur ces critères et l'évidence d'un risque élevé d'erreur de mesure. Finalement, la position de la tête haute ou basse selon un consensus entre les observateurs en prenant comme repère anatomique les épaules de la vache pour situer la tête de la vache.

La fiabilité intra-observateur était satisfaisante pour l'ensemble des critères ($CCI > 0,70$) ce qui permettait de tester la validité des mesures.

Table III - Fiabilité inter-observateur et intra-observateur

| Comportement | CCI MLdC et PR | CCI MLdC et DF | CCI DF et PR | CCI Intra- observa- teur |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|---|
| Position debout | 0.99 | 0.96 | 0.96 | 0.99 |
| Position couchée | 0.97 | 0.90 | 0.88 | 0.99 |
| Tête devant haute | 0.61 | 0.61 | 0.39 | 0.89 |
| Tête devant basse | 0.69 | 0.52 | 0.43 | 0.88 |
| Oreilles droites au repos | 0.71 | 0.72 | 0.71 | NC |
| Oreilles derrières | 0.55 | 0.38 | 0.48 | NC |
| Yeux ouverts | 0.55 | 0.67 | 0.54 | NC |
| Museau normal | 0.92 | 0.84 | 0.87 | 0.94 |
| Museau mouvement léchage | 0.91 | 0.57 | 0.62 | 0.95 |
| Rumination | 0.84 | 0.70 | 0.73 | 0.74 |
| Aucun soin corporel | 0.92 | 0.78 | 0.82 | 0.80 |
| Interaction sociale | 0.60 | 0.49 | 0.52 | 0.73 |
| Immobile | 0.84 | 0.75 | 0.70 | 0.79 |
| Agitation debout | – | – | – | 0.67 |
| Agitation couchée | – | – | – | 0.72 |
| Abs personne | 0.94 | 0.75 | 0.77 | – |
| Comportement alimentaire | – | – | – | 0.83 |
| Inactive | 0.88 | 0.74 | 0.77 | 0.93 |

CCI : Coefficient de corrélation intraclasse; _ non analysé;
NC : non codé

3.2 Article 2

Rialland P¹, Authier S^{1,2}, Guillot M¹, Del Castillo JRE¹, Veilleux-Lemieux D¹, Frank D¹, Gauvin D¹, Troncy E¹ (2012). **Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: A prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study.** PLoS One 7(11): e49480 (Facteur d'impact sur 5 ans de 4,244).

¹ Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Department of Biomedical Sciences, Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada. ² CiToxLAB North America, Laval, Quebec, Canada

Corresponding author*:

Dr. Eric Troncy, Professor.

Faculty of veterinary medicine, Université de Montréal, P.O. Box 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Running title head: Validation of pain assessment methods in dogs

3.2.1 Contexte de la recherche

Cette deuxième étude poursuit l'évaluation de la validation des mesures en partant d'une définition unique de l'expression de la douleur chez l'animal (sans distinction d'espèces ni de conditions de douleur). L'étude préliminaire chez le bovin a démontré la validité des changements neurosensoriels (test de sensibilité mécanique, bio-marqueur cérébro-spinaux) et du comportement (observé par vidéo-analyse) en lien avec la douleur. L'étude a permis d'identifier de mesures utilisables pour la douleur aiguë (comportement observé par vidéo-analyse) et de mesures utilisables pour la douleur chronique (comportement observé par vidéo-analyse et mesure de sensibilité mécanique, bio-marqueurs cérébro-spinaux). D'autres mesures n'étaient pas valides comme les mesures physiologiques (l'AED et le cortisol plasmatique). De l'ensemble des mesures, la vidéo-analyse semble la meilleure méthode en identifiant des comportements qui différencient les groupes de traitement de ce contexte de douleur viscérale chez le bovin. Ces résultats suggèrent que la validité de l'utilisation de telles mesures soit confirmée dans une approche continue de la mesure de la douleur.

Le choix d'un nouveau modèle sur une espèce différente permet de faire une translation entre les espèces et les origines de la douleur pour répondre aux objectifs de l'étude pour établir une continuité dans la procédure de validité de l'utilisation des mesures de la douleur

La douleur articulaire est une condition très différente de la douleur viscérale. Le choix de la douleur articulaire chez le chien présente un avantage car la douleur articulaire chez le chien est associée à la boiterie, aiguë ou chronique, qui est mesurable objectivement à l'aide de méthodes usuellement utilisées et établies comme des mesures de référence. À

l'inverse, même si les mesures ponctuelles de stress, de l'activité physiologique, des échelles linéaires et des échelles de douleur, dont les échelles de douleur post-chirurgicales comme l'échelle de douleur 4A-VET, ont été développées et sont disponibles avant le début du programme de recherche, la validité de ces mesures a été peu étudiée dans une étude de la validité des mesures.

L'objectif principal est d'étudier la fiabilité et la validité de mesures (validation de construit et de convergence) de la douleur articulaire aiguë induite chirurgicalement chez le chien. Les mesures testées sont communes aux mesures de la douleur aiguë dont la validité a été testée au cours de l'étude bovine. Également, l'étude avait pour objectif secondaire de confirmer les résultats préliminaires obtenus avec le modèle de douleur bovine par comparaison aux mesures de l'étude canine et d'étudier la validité des mesures en évaluant la capacité à caractériser l'atteinte articulaire, comme étant la cause de la douleur et établir les liens qui unissent la douleur à l'atteinte articulaire lors de douleur aiguë

L'hypothèse de recherche est basée sur la capacité de la mesure à différencier des intensités de douleur en lien avec une gestion de la douleur postopératoire par palier (suivant l'administration d'analgésique de différentes qualités analgésiques (faible, moyen et élevé)).

3.2.2 Résumé

Chez le chien, la douleur est évaluée à l'aide de grilles d'intensité de douleur, de mesures physiologiques et comportementales. L'utilité des ces méthodes dépend d'un processus continu de validation établi pour différentes conditions expérimentales, incluant les douleurs orthopédiques

postopératoires. La douleur orthopédique est considérée comme l'une des plus sévères en traumatologie et en condition postopératoire chez le chien. La validité des méthodes d'évaluation de la douleur postopératoire est incertaine par rapport au niveau de réponse aux analgésiques, et aux interférences potentielles induites par ces derniers.

L'objectif est d'établir la validité de méthodes d'évaluation de la douleur lorsqu'une douleur induite par une trochléoplastie est modulée par l'activité analgésique des traitements. L'hypothèse est que la vidéo-analyse (en référence), l'AED, et deux grilles de douleur subjectives (VAS et 4A-VET) détecteront différents niveaux d'intensité de douleur après une procédure standardisée de chirurgie trochléoplastie. Dans cette étude prospective, en aveugle, randomisée, les chiens furent répartis aléatoirement selon 3 groupes : groupe 1, placebo, (n = 10); groupe 2, analgésie préventive multimodale (opioïdes et AINS) (n = 5) et groupe 3, analgésie unimodale préventive (tramadol) (n = 10). L'anesthésie générale et la trochléoplastie standardisées sont réalisées à J1. Les évaluations en aveugle sont effectuées avant la chirurgie, durant l'anesthésie puis répétées sur une période postopératoire de 48 heures. La fiabilité (fiabilité inter- et intra-observateur) et la sensibilité des mesures de la douleur incluaient la fréquence des comportements enregistrés avec la vidéo-analyse, les échelles de douleur 4A-VET (divisée en composantes orthopédique et comportementale interactive) et VAS, et la mesure de l'AED ont été testées par des équations d'estimation généralisées (pour les changements dans le temps entre les groupes) et par une régression multivariée (pour tester la significativité des relations entre les échelles de douleur et la vidéo-analyse).

Une heure suivant la chirurgie, le groupe 1 avait la plus forte conductance dermique exprimant une réponse sympathique augmentée. Le

groupe 2 avait les plus bas scores de la composante orthopédique de 4A-VET mais leurs scores de composante comportementale interactive étaient les plus élevés de 12h à 48h suivant la chirurgie. La vidéo-analyse réalisée 24 et 48 heures après la chirurgie démontrait plus d'atteinte fonctionnelle du membre opéré pour le groupe 1 en comparaison des groupes 2 et 3. L'activité motrice et la composante comportementale de l'échelle 4A-VET n'étaient pas sensibles de la douleur et étaient sensibles à la sédation chez les chiens des groupes 2 et 3. Finalement, l'augmentation de la fréquence de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' était associée à la diminution des scores de la composante orthopédique de 4A-VET.

La composante orthopédique de 4A-VET, la mesure de la réponse sympathique et la vidéo-analyse décrivent différentes sévérités de douleur, ce qui confirme la validité de leurs mesures en lien avec l'hypothèse de l'étude (différentes intensités de douleur). La douleur se manifeste majoritairement par une diminution de la fonction locomotrice. La sédation était un facteur confondant de l'évaluation de douleur. Cette étude démontre clairement la convergence des méthodes de mesure. Toutefois, la fiabilité et la sensibilité des mesures sont différentes. Cela suppose un tri des mesures qui présentent les meilleures qualités métriques.

Synthèse – Cette étude supportait la supériorité de la vidéo-analyse face aux évaluations subjectives pour l'étude de la douleur durant les 24 heures postopératoires. Surtout, la vidéo-analyse identifiait les comportements associés à la douleur, interprétait les scores de douleur de l'échelle 4A-VET et relevait l'influence de l'effet sédatif des analgésiques sur l'expression de la douleur. Finalement, l'effet sédatif des analgésiques était un facteur confondant majeur pour valider des méthodes de mesure.

3.2.3 Abstract

In the context of translational research, there is growing interest in studying surgical orthopedic pain management approaches that are common to humans and dogs. The validity of postoperative pain assessment methods is uncertain with regards to responsiveness and the potential interference of analgesia.

The hypothesis was that video analysis (as a reference), electrodermal activity, and two subjective pain scales (VAS and 4A-VET) would detect different levels of pain intensity in dogs after a standardized trochleoplasty procedure. In this prospective, blinded, randomized study, postoperative pain was assessed in 25 healthy dogs during a 48-hour time frame (T). Pain was managed with placebo (Group 1, n = 10), preemptive and multimodal analgesia (Group 2, n = 5), or preemptive analgesia consisting in oral tramadol (Group 3, n = 10). Changes over time among groups were analyzed using generalized estimating equations. Multivariate regression tested the significance of relationships between pain scales and video analysis.

Video analysis identified that one orthopedic behavior, namely ‘Walking with full weight bearing’ of the operated leg, decreased more in Group 1 at T24 (indicative of pain), whereas three behaviors indicative of sedation decreased in Group 2 at T24 (all $p < 0.004$). Electrodermal activity was higher in Group 1 than in Groups 2 and 3 until T1 ($p < 0.0003$). The VAS was not responsive. 4A-VET showed divergent results as its orthopedic component (4A-VETleg) detected lower pain in Group 2 until T12 ($p < 0.0009$), but its interactive component (4A-VETbeh) was increased in Group 2 from T12 to T48 ($p < 0.001$). Concurrent validity established that 4A-VETleg scores the painful orthopedic condition accurately and that pain

assessment through 4A-VETbeh and VAS was severely biased by the sedative side-effect of the analgesics. Finally, the video analysis offered a concise template for assessment in dogs with acute orthopedic pain. However, subjective pain quantification methods and electrodermal activity need further investigation.

3.2.4 Introduction

Postoperative pain remains the main cause of morbidity related to surgery. Spontaneous nociceptive pain has been associated with both skin incisions (Brennan et al., 2005) and deep surgery (Xu and Brennan, 2009). Using a rodent knee surgery model, Buvanendran et al. (2008) also characterized some functional (behavioral) outcomes. In addition, nociceptive stimulation and neuronal changes might differ between those observed in models of acute postsurgical pain (Xu and Brennan, 2009) and chemical models of acute inflammation like sodium urate-induced synovitis in dogs (Schumacher et al., 1974; Punke et al., 2007; Budsberg et al., 2011). In this context, a standardized and technically well-recognized canine orthopedic surgery might be a stronger surrogate of surgical pain than a chemically inflammatory pain model in dogs. Altogether, rodent models and chemical models would present a limited approach to the complex process of pain associated with orthopedic surgery. Veterinary surgeons, on the other hand, manage many natural painful disease processes that are common to both dogs and human beings (Quessy, 2010), and they perform preclinical and clinical orthopedic procedures in dogs, some of which are directly derived from procedures used in human beings (Liska and Doyle, 2009). Consequently, we argue that common orthopedic dog surgeries, as trochleoplasty, are valid surrogates for the investigation of human surgical pain (Ji et al., 2012; Mann

et al., 2012). However, methods of pain assessment in dogs are not extensively documented or standardized (Holton et al., 2001; Laboissière, 2006; Reid et al., 2007). Inadequate pain assessment for dogs decreases the validity of canine pain models and hampers the comparison of pain studies.

Both owners (Väisänen et al., 2008) and veterinarians (Hugonnard et al., 2004; Williams et al., 2005) associate orthopedic surgery with a high degree of pain. Behavioral (guarding, interaction with owner, reaction to palpation, etc.) and physiological (cardiovascular indices and stress response) indicators are commonly used to assess pain in non-verbal patients (Zimmermann, 1983). Composite pain scales and multidimensional questionnaires have been developed for use in a wide range of canine postoperative pain conditions (Holton, et al., 2001; Laboissière, 2006; Reid, Nolan et al., 2007). According to the Cohen's classification (Cohen et al., 2008), both postoperative pain scales Glasgow Composite Pain Scale and University of Melbourne Pain Scale were developed in compliance with the psychometrics rules. However, these instruments did not differentiate the analgesic effect of the standard non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) from this of the Coxib (Gruet et al., 2011) or fentanyl [(Lafuente et al., 2005) in pain studies with canine orthopedic surgery. In contrast, kinetic gait analysis using a force plate or a pressure-sensing weight mattress decreased following sodium urate-induced acute synovitis in dogs (Borer et al., 2003; Hazewinkel et al., 2003) and improved following NSAID drug administration (Lipscomb et al., 2002; Hazewinkel et al., 2003; Hazewinkel et al., 2008). Kinetic gait analysis did not correlate well with the subjective lameness scoring in dogs (Horstman et al., 2004; Quinn et al., 2007; Waxman et al., 2008; Oosterlinck et al., 2011), which supported the kinetic analysis to be a more sensitive indicator of joint pain than subjective lameness scoring.

Even if kinetic gait analysis is a great asset in lameness study, it might not capture the broader aspects of pain (Melzack and Wall, 1965) and is not available in every clinical center. Recently, the behavioral assessment of rodent pain has evolved with the use of semi-automated behavioral video analysis (Roughan and Flecknell, 2006) and standardized behavioral facial expression coding systems (Langford et al., 2010). Previously, video analysis of spontaneous behaviors in dogs after ovariohysterectomy allowed unique discrimination between pain-related behaviors and drug side effects, such as sedation (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000), but this pain monitoring method has not yet been used following canine orthopedic surgery.

The purpose of the present study was to evaluate methods of pain assessment following canine orthopedic surgery. The hypothesis was that the effects of three different levels of analgesia would be reflected and therefore recognizable by the behavioral and physiological changes they elicit on a standardized canine postoperative pain model. Several methods (video analysis of spontaneous behaviors, electrodermal activity [EDA], visual analogue scale [VAS], and composite pain scale [4A-VET pain scale]) were used for the assessment of postoperative pain to evaluate their reliability and responsiveness. The concurrent validity of the behavioral pain assessment tools was tested using video analysis as the reference method.

3.2.5 Results

3.2.5.1 Rescue Analgesia

Rescue analgesia was provided for 25% of all dogs. Rescue analgesia requirements were distributed as follows: three dogs from Group 1 at Time (T)0.41, T6.01 and T6.31, one dog from Group 2 at T24.01, and two dogs

from Group 3 at T1.19 and T6.19 hours postoperatively, with T0 being the extubation time.

3.2.5.2 Video Analysis of Spontaneous Behaviors

Of all the spontaneous behaviors identified in our ethogram (Appendix 1), fourteen that occurred frequently were statistically analyzed and their reliability tested (Table I). Eleven behaviors presented a moderate to high inter-observer reliability, as their intraclass correlation coefficient ranged from 0.50 to 0.99.

For ‘Walking with full weight bearing’, ‘Howling’, ‘Sniffing’, and ‘Licking lips’, generalized estimating equation (GEE) analysis indicated significant main effects for time and group, as well as a significant interaction between group and time (Table II). For the occurrence rates of ‘Standing with full weight bearing’, and ‘Dog in front of the kennel,’ there was no group effect, but there were significant effects of time and a significant interaction between group and time (Table II). There were no significant interactions between group and time for the remaining behaviors, thus explaining why they were discarded from further analyses.

The planned comparison analysis over time indicated that the occurrence rates of the remaining behaviors (as listed in Table III) were not different across groups at baseline: T-96 (all $p > 0.08$). From T-96 to T24, the occurrence rate decreased for ‘Walking with full weight bearing’, ‘Standing with full weight bearing’, ‘Howling’, and ‘Sniffing’ in all treatment groups (all $p < 0.0001$, Table III). Furthermore, for ‘Licking lips’ and ‘Dog in front of the kennel’, the occurrence rates declined in Group 2 ($p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively) and Group 3 ($p = 0.001$, and $p = 0.0002$,

respectively) from T-96 to T24 (Table III) but did not change in Group 1 ($p = 0.69$, and $p = 0.09$, respectively).

At T24, the estimated occurrence of 'Walking with full weight bearing' was 43.3 (95% confidence interval [95%CI]: 11.1, 170.7; $p < 0.0001$), and 36.2 (95%CI: 4.5, 285.7; $p = 0.0007$) times higher in Group 3 than in Groups 1 and 2, respectively (Table III). Also at T24, the estimated occurrences of 'Howling', 'Licking lips', and 'Dog in front of the kennel' were 29.0 (95%CI: 3.5, 235.4; $p = 0.001$), 23.6 (95%CI: 8.6, 65.0; $p < 0.0001$), and 7.7 (95%CI: 3.1, 18.9; $p = 0.003$) times higher, respectively, in Group 1 than in Group 2. Moreover, the observed difference between Groups 1 and 2 for 'Licking lips' persisted at T48 with an estimated risk ratio of 10.4 (95%CI: 3.9, 27.8; $p < 0.0001$) (Table III). The occurrence of 'Licking lips' was also higher in Group 3 than in Group 2 both at T24 and T48, with estimated risk ratios of 13.9 (95%CI: 5.1, 38.3; $p < 0.0001$) and 10.9 (95%CI: 4.1, 28.8; $p < 0.0001$), respectively (Table III).

3.2.5.3 Electrodermal Activity

The EDA measurements at T-96 were not correlated with those at T-5 (Spearman's rank correlation (ρ) = 0.001, $p = 0.87$), and Cohen's kappa coefficient (κ) could not be computed. The EDA measurement analysis indicated an overall time effect ($p < 0.0001$), and a significant interaction between group and time ($p < 0.0001$), but there was no significant group effect ($p = 0.40$). The planned comparisons showed that the EDA measurements of Group 1 were higher than those of Groups 2 and 3 at T0.5 ($p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively) and T1 ($p < 0.0001$, and $p = 0.0003$, respectively) (Figure 1).

3.2.5.4 Pain Scales

The VAS reliability was not estimated, because all of the scores were 0 at T-96 and T-5. For the composite pain scale, namely 4A-VET pain scale, scores at T-96 and T-5 were correlated ($r_{hos} = 0.52$; $p = 0.008$) and demonstrated fair agreement ($\kappa = 0.33$, 95%CI: 0.08, 0.57) (Landis and Koch, 1977). Cronbach's alpha coefficient was 0.7, indicating that the items of the 4A-VET pain scale were homogeneous.

An analysis of the VAS scores indicated overall effects of time ($p < 0.0001$) and group ($p = 0.003$), as well as a significant interaction between group and time ($p < 0.0001$). At T24, Group 2 presented higher pain scores than Groups 1 and 3 ($p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively) (Figure 2A).

An analysis of the 4A-VET scores indicated overall effects of time ($p < 0.0001$) and group ($p < 0.0001$), as well as a significant interaction between group and time ($p < 0.0001$). Group 2 presented lower scores than Groups 1 and 3, at T0.5 (both $p < 0.0001$), T1 (both $p < 0.0001$) and T2 ($p = 0.0009$, and $p = 0.0012$, respectively) (Figure 2B).

An analysis of the behavioral component of 4A-VET (4A-VETbeh) scores showed overall effects of time ($p < 0.0001$) and group ($p < 0.0003$), as well as a significant interaction between group and time ($p < 0.0001$). Group 2 had higher 4A-VETbeh scores than Groups 1 and 3, at T12 ($p = 0.0001$, and $p = 0.0003$, respectively), T36 ($p = 0.0002$, and $p = 0.0003$, respectively), and T48 ($p = 0.0011$, and $p < 0.0001$, respectively) (Figure 2C). In addition, the 4A-VETbeh scores of Group 2 were higher than those of Group 3 at T9 ($p = 0.0015$) and those of Group 1 at T24 ($p = 0.0002$) (Figure 2C).

An analysis of the orthopedic component of 4A-VET (4A-VETleg) scores indicated main effects of time ($p < 0.0001$) and group ($p < 0.0001$), as

well as a significant interaction between group and time ($p < 0.0001$). Group 2 presented significantly lower 4A-VETleg scores than Groups 1 and 3, at T0.5 (both $p < 0.0001$), T1 (both $p < 0.0001$), T2 ($p = 0.0002$, and $p = 0.0009$, respectively), T6 ($p < 0.0001$, and $p = 0.0002$, respectively), and T12 (both $p < 0.0001$) (Figure 2D). Additionally, the 4A-VETleg scores of Group 2 were lower than those of Group 3 at T3 ($p = 0.0008$) (Figure 2D).

3.2.5.5 Concurrent Validity

A multivariate GEE regression analysis indicated that all of the pain scores were negatively associated with the administration of rescue analgesia (β estimate \pm SE: -0.92 ± 0.30 ; $p = 0.002$ for VAS, -2.19 ± 0.58 ; $p = 0.0002$ for 4A-VET, -2.20 ± 1.04 ; $p = 0.04$ for 4A-VETbeh, and -0.92 ± 0.30 ; $p = 0.002$ for 4A-VETleg). Except for 4A-VETbeh, all pain scores were positively associated with time (0.79 ± 0.14 ; $p < 0.0001$ for VAS, 0.89 ± 0.29 ; $p = 0.002$ for 4A-VET, and 0.79 ± 0.14 ; $p < 0.0001$ for 4A-VETleg). In addition, VAS scores were negatively associated with the occurrence of two behaviors: ‘Walking with full weight bearing on the operated limb’ (-0.13 ± 0.04 ; $p = 0.0003$) and ‘Dog in front of the kennel’ (-0.14 ± 0.06 ; $p = 0.03$), while 4A-VET scores were negatively associated with ‘Walking with full weight bearing’ (-0.22 ± 0.03 ; $p < 0.0001$). 4A-VETbeh scores were positively associated with ‘Immobile with head down’ (0.42 ± 1.04 ; $p = 0.02$) and negatively associated with ‘Sniffing’ (-0.43 ± 0.10 ; $p < 0.001$). Finally, 4A-VETleg scores were positively associated with ‘Standing with no weight bearing on the operated limb’ (0.73 ± 0.25 ; $p = 0.004$) and negatively associated with both ‘Walking with full weight bearing’ (-0.20 ± 0.06 ; $p = 0.002$) and ‘Sitting normally with equal weight on limbs’ (-0.57 ± 0.26 ; $p = 0.04$).

3.2.6 Discussion

In this model, the hypothesis was that Group 1 would present the most pain, Group 2 the least, and Group 3 intermediate pain. The results partially support this hypothesis although no behavioral or physiological assessment demonstrated the expected gradient of pain response (Group 1 > Group 3 > Group 2). Group 1 did present more pain than the other two groups, as demonstrated clearly by one video analysis criterion, namely ‘Walking with full weight bearing’ (Group 1 ≠ Group 3, at T24), as well as by 4A-VETleg (Group 2 ≠ Groups 1 and 3, at T0.5, 1, 2, 3, 6, and 12) and EDA (Group 1 ≠ Groups 2 and 3, at T0.5, and 1). Heavy sedation appears to explain the lack of specificity in pain detection by the other methods (namely VAS and 4A-VETbeh). Most interestingly, the multimodal analgesia group (#2) was higher than would be expected for VAS at T24 and for 4A-VETbeh at T9, 12, 24, 36, and 48. This was definitively a concurring and surprising discovery. Inclusion of anesthesia/drug controls would have assisted in determining the effects of sedation. In fact, video analysis confirmed that analgesic drug-induced sedation decreased some behaviors because dogs in Group 2 spent less time acting interested to their environment (‘Dog in front of the kennel’), or trying to attract attention (‘Howling’), and making facial expressions (‘Licking lips’). With regards to our specific objectives, we observed good reliability for eleven behaviors in the video analysis (see Table I) and for the 4A-VET pain scale. We could not evaluate VAS reliability, and EDA reliability was poor. Establishing measurement reliability was an obligatory step before we could assess responsiveness and concurrent validity.

In animal video analysis, there are numerous methods for recording behavioral changes. In this study, we performed a microanalysis approach of events based on a quantitative description of an animal’s normal behavior.

The method generated a wide range of behaviors and occurrences. Only behaviors that demonstrated significant occurrence rates and high inter-observer reliability were selected as final endpoints. This selection method could be considered quite limiting, particularly as the duration of video was a one hour-period, and the inter-observer reliability was tested on 10% of randomized videotapes. We deemed that these strict behavioral criteria would be strongly representative of postsurgical orthopedic pain.

A decreased occurrence rate of ‘Walking with full weight bearing’ was demonstrated in all treatment groups following trochleoplasty compared to normal behavior. At T24, this decrease was higher in Group 1 than in Group 3, suggesting that tramadol in the latter group provided some analgesia-related use of the operated limb. Intuitively, it makes sense to measure the occurrence rate of ‘Walking with full weight bearing on the operated limb’ as a measure of orthopedic pain (or, at least as a measure of an absence of lameness) but no previous study has investigated this measurement as an indicator of pain.

So far, it was postulated that the degree of pain would correlate to the degree of weight bearing using force plate systems. Unexpectedly, the occurrence rate of the spontaneous behavior ‘Standing/walking/trotting with no or partial weight bearing’ (as indicator of lameness) did not discriminate different levels of pain and indicated the lack of specificity of this measurement using video-analysis. It is also possible that the observer-reported behavior was less accurate in quantifying lameness than evaluating absence of lameness in dogs. This hypothesis would be in accordance with previous publications reporting a lack of correlation between subjective lameness scores and weight bearing measurements recorded through kinetic gait analysis in canine studies (Hoelzler et al., 2004; Horstman et al., 2004;

Quinn, Keuler et al., 2007; Waxma, Robinson et al., 2008). Nevertheless, postoperative pain was correlated to a decrease in the occurrence rate of a normal behavior ‘Walking with full weight bearing of the operated leg’, suggesting that this latter behavior was a specific pain-free behavior. Our result supported that first, painful dogs were less active (walk, trot); second, the dogs were either lame or not lame when they were active; and third, the naturally occurring behavior of severity of lameness was not correlated to pain severity using video-analysis. Altogether, recording of a spontaneous behavior should not be interpreted in the same way as kinetic gait analysis. Kinetic gait analysis was currently performed when dogs were compelled to walk or trot, suggesting a sustained nociceptive firing during limb use. Indeed, video-analysis would summarize the way the dogs behaved and responded to postoperative pain, suggesting a cognitive adaptation to pain. Therefore the sensitivity of the behavioral quantification of ‘Walking with full weight bearing of the operated leg’ supports its use for further study as a new surrogate for assessing pain in clinical conditions.

‘Howling’ frequency differentiated Group 2 from Group 1 at T24, and the difference between Groups 2 and 3 approached significance ($p = 0.006$ –Table III). It is generally acknowledged that increased vocalization is associated with postoperative pain expression in the dog as reflected by the inclusion of this behavior in many canine postoperative pain scales (Firth and Haldane, 1999; Dzikiti et al., 2006; Reid, Nolan et al., 2007). However, a decrease in ‘Howling’ in all three groups could indicate that postoperative pain decreased the occurrence rate of ‘Howling’, particularly for Group 1. That the decrease was more pronounced in Group 2 suggests that the use of a multimodal analgesic protocol may have contributed more to the decrease than did pain. Indeed, the occurrence rate did not return to its baseline value

in any group. This finding supports vocalization's lack of sensitivity to postoperative pain intensity, as was observed in a previous study (Dzikiti et al., 2006).

The occurrence rates of both 'Dog in front of the kennel' and 'Licking lips' behaviors decreased in Group 2 when compared to Group 1 and decreased in both analgesic groups over time, while remaining stable over the same period in Group 1. Moreover, Group 2 spent less time 'Licking lips' during the overall postoperative period. Altogether, the decreased occurrence rate observed in both pharmacologically treated groups, and mostly in Group 2, may simply not be related to a pain-controlling effect but rather may be related to a sedative effect of the different opioids (fentanyl patch, epidural morphine, and oral tramadol). Similar results were previously observed following administration of butorphanol in a canine pain study (Fox et al., 2000). These results highlight the major interference of the neuropharmacological effects of commonly used analgesic (opioid) drugs in the apparent expression of postoperative pain. The frequency of these two behaviors did not change over time in Group 1, suggesting that they were not affected by postoperative pain. Thus, the observations regarding restlessness/interest in the environment indicated by 'Dog in front of the kennel' and 'Licking lips' behaviors should be analyzed with caution and may not demonstrate assay sensitivity for comparing analgesic protocols.

Altogether, video analysis was a powerful method that provided evidence of pain related behaviors and identified behaviors related to drug side-effects. The low number of selected and validated spontaneous behaviors is related to inter-subject variability in pain expression and to the difficulty associated with standardizing a behavioral observation for assessing pain. These results support the use of video analysis as a valid pain assessment tool

because of its ability to test concurrent validity with subjective behavioral pain assessments. The concurrent validity analysis completed in this study confirmed sedation's major influence not only on video analysis but also on VAS and 4A-VETbeh scores.

In this study, EDA and 4A-VET were responsive to multimodal analgesia in the immediate postoperative period by reporting decreased skin conductance, a known method for indirectly quantifying sympathetic activity and decreased (4A-VET) pain scores, respectively, in Group 2. There were slight discordant responses between EDA measurements and 4A-VET scoring. With EDA, Group 1 demonstrated higher pain intensity compared to Groups 2 and 3, whereas with 4A-VET, the intensity of pain was lower in Group 2 than in both Groups 1 and 3 at similar time points.

The most plausible explanation for the decreased EDA intensity in Groups 2 and 3 was the analgesia/anxiolysis induced by either treatment. This analgesic detection is supported by a study where the EDA intensity correlated significantly with kinetic gait analysis, telemetered motor activity and subjective scoring to demonstrate analgesic effect of a bisphosphonate in an experimental dog osteoarthritis model (Moreau et al., 2011). Hypothetically, the EDA decrease could also be related to other pharmacological interactions with sympathetic activity (Guedes et al., 2007; Valtolina et al., 2009; Vettorato et al., 2010). Moreover, the sensitivity of EDA was not important, as highlighted by the absence of a difference between Groups 2 and 3 and the short duration of its effectiveness to differentiate Group 1 from both Groups 2 and 3. This low psychometric quality added to the previously reported lack of specificity in a rodent model of surgical pain (Richardson et al., 2007). Further investigation is needed before considering increasing the clinical use of EDA.

Although other canine pain studies have validated the pain VAS (Marucio et al., 2008; Shih et al., 2008), different treatment effects on mean VAS scores following trochleoplasty were not demonstrated in this study. The VAS might have provided systematic error, particularly when measuring pain at baseline (floor effect) and during the postoperative period (ceiling effect). The VAS observer could not be blinded to the presence or the absence of surgery because sham dogs were not included, and therefore this was an evident first source of bias (explaining the floor effect). Furthermore, increased VAS scores in Group 2 at T24 suggested that sedative side-effects of analgesics might interfere with VAS scoring. Confounding effect of analgesic side effect on VAS score (increasing it) was previously observed (Pacharinsak et al., 2003; Kona-Boun et al., 2006). This could explain the lack of sensitivity in postoperative pain quantification using the VAS and the absence of a treatment effect using this method. Altogether, these findings urge for caution in the use and interpretation of observer-reported VAS pain scoring as a standardized pain assessment method with experimental animals as it could be biased and not specific for pain.

The 4A-VET pain scale showed acceptable reliability and, as reported earlier, was partially responsive to treatments. Nevertheless, like EDA, 4A-VET demonstrated weak performance because of its apparent low sensitivity (no difference between Groups 1 and 3) and short duration (initial 2 hours post-surgery) of effective responsiveness in favor of Group 2. Interestingly, the weak performance of the 4A-VET pain scale could be explained by the response divergence between its two main components, namely 4A-VETbeh and 4A-EVTleg. The 4A-VETleg scores indicated significantly lower pain in Group 2 compared to Groups 1 and 3 at T0.5, 1, 2, 3, 6, and 12. Conversely, 4A-VETbeh scores indicated increased pain for Group 2 compared to Groups

1 and 3 at T9, 12, 24, 36, and 48. Considered together, these results suggest that non-analgesic effects of the multimodal analgesia protocol used in Group 2 may have been a potential confounder in pain assessment, as has been observed in previous canine postoperative pain studies (Dzikiti et al., 2006; Shih, Robertson et al., 2008). The differences between the mean scores of 4A-VETbeh and 4A-VETleg might also illustrate differences in scale construction. This is a strong argument for choosing 4A-VETleg as a standard measure of orthopedic postoperative pain. Nevertheless, 4A-VETleg had some limitations because it was not as responsive at T24 as was the video analysis, suggesting that 4A-VETleg was valid during at least the first twelve hours following surgery. At this point, the validity of behavioral pain assessment based on pain scoring systems is uncertain because many questions remain in relation to measurement errors and the difficulty of weighing the consequence of sedation against those of unrelieved pain, as has already been observed (Guillot et al., 2011).

Using video analysis, ‘Walking with full weight bearing’ of the operated limb was the only validated behavior to support the analgesic efficacy of tramadol as well as to indicate the presence of pain in Group 1. Analgesic side-effects strongly associated with behavioral changes. Regression methods were used to test the concurrent validity of the pain scales scores with video analysis as the standard of the behavioral pain assessment. Of all displayed behaviors, ‘Walking with full weight bearing on the operated limb’ was the behavior that was most correlated with the VAS, 4A-VET and 4A-VETleg pain scores. It is possible that the relationship between the pain scales and ‘Walking with full weight bearing’ occurred for several reasons: 1) this behavior was more frequent; 2) this higher frequency could be attributed to a more conservative and well-understood definition,

allowing it to be observed with more accuracy; and 3) recording during daytime might have improved the robustness of the occurrence rate of ‘Walking with full weight bearing’ in relation to the dog’s level of daylight activity.

Additionally, it appears this behavior (‘Walking with full weight bearing’) is unconsciously linked to pain-free behavior for VAS and 4A-VETleg. Moreover, for the latter, pain intensity was clearly linked to lameness (reflected by ‘Standing with no weight bearing’), thus reinforcing the conceptual validity of 4A-VETleg scores. Interestingly, the regression analysis in this study confirmed the previously suspected limitations in the pain scoring systems. First, sedative side-effect of the drug(s) was a confounding factor for assessing pain with VAS because VAS was linked to the spontaneous behavior ‘Dog in front of the kennel’ that changed in response to the side-effect of the analgesic. Second, the regression models revealed that 4A-VETbeh scores were related to two spontaneous behaviors, ‘Immobile with head down’ and ‘Sniffing’, which were not validated by the video analysis and were assumed to be included in the communicative category. The video analysis confirmed that the present 4A-VETbeh was not an accurate method for pain evaluation in this study. The results also showed strong evidence that the large number of items in the composite 4A-VET pain scale introduces noise into this pain scoring system.

Pain expression may hypothetically differ when an animal is observed directly as opposed to being filmed without a person in the environment. This could, evidently, lead to differences in pain observation using various methods. The advantage of video analysis for pain expression is that it can be used as a reference method to introduce further development of pain scales (Hadjistavropoulos and Craig, 2002), as has been previously performed in

dogs (Guillot et al., 2011). It is important to consider that many factors can influence the measurement of pain. It has been proposed that not only the pain stimulus itself, but observer characteristics, environmental and social interaction effects, and intra-subject factors can all influence the measurement of pain. This can occur via effects on the pain experience, as well as on its expression (Hadjistavropoulos and Craig, 2002). In this study, the standardization of procedures allowed us to control all of these aspects, except the intra-subject experience.

An important limitation of the study was the apparent moderate intensity of postoperative pain generated by the trochleoplasty procedure, as reflected by the low levels of pain scale scoring, as well as the low use of rescue analgesia in Groups 1 and 3. This could be related to an inadequate sensitivity of pain scales. A higher intensity of pain would surely have contributed to better discrimination in pain assessment method responsiveness.

In conclusion, the video analysis provided strong evidence of responsiveness and validity of the 4A-VETleg pain scale for assessing acute orthopedic pain. The alteration of normal gait behavior, as observed by changes in 'Walking with full weight bearing,' is likely to be the best behavioral orthopedic pain assessment method. The current results will hopefully contribute to the generation of a refined and validated method of orthopedic pain assessment. This study also clearly establishes the major interference of analgesic side effects on dog behaviors. This is a major finding with regards to the use of opioid drugs as a staple in the surgical analgesic arsenal in veterinary and human medicine. Such interference could potentially contribute to the overdosing of opioids.

3.2.7 Methods

3.2.7.1 Ethics statement, animals and experimental design

The Institutional Animal Care and Use Committee approved the study protocol (# Rech-1220), and the Canadian Council on Animal Care guidelines were followed regarding care and handling of the dogs. This study also adhered to the guidelines of the Committee for Research, Ethical Issues of the IASP [17] and the ARRIVE checklist (Kilkenny et al., 2010). Twenty-five healthy male beagle dogs (15.2 (3.3) [mean (SD)] months old and weighing 9.9 (1.4) kg) belonging to the colony of a contract research organization (CiToxLAB North-America, Inc.) accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International were included. Dogs were acclimated for 1 week and housed in individual kennels under standard laboratory conditions in a 12 h light/dark cycle with food and water provided *ad libitum*. Dogs were maintained in standard environmental conditions (humidity, temperature, and ventilation).

Baseline evaluations were carried out before surgery at –96 h (video analysis occurrence rate of spontaneous behaviors, EDA measurements and pain scales scores) and –5 h (EDA measurements and pain scales scores). Then, the dogs were subjected to a standardized trochleoplasty and general anesthesia. The time of tracheal extubation was defined as the time “zero” (T0) hour post-surgery. Video recording of the spontaneous behaviors was also performed at T24 and T48 post-surgery. Measurements of EDA and pain scales scores were recorded at T0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 36, and 48 post-surgery. One observer (SAU), blinded to dog group attribution, performed live assessments in the following sequential order: VAS, 4A-VET, and EDA.

Another observer (DVL) performed the video analysis of the spontaneous behaviors.

The dogs were randomized into three groups. Group 1 dogs (n = 10), received an oral placebo (Dextrose, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) between 3 to 2.5 h before T0 (i.e., approximately 1.5 h before starting surgery), and the administration was repeated every 6 h until study completion. Group 2 dogs (n = 5) received a multimodal pre-emptive analgesia consisting of the following: 1) a transdermal fentanyl patch (2–3 µg/kg, Duragesic™ 50, Janssen-Ortho Inc., Toronto, ON, Canada) applied to the skin 24 h prior to the surgery and maintained in place until study completion; 2) an epidural mixture injection of morphine sulfate (0.1 mg/kg, Morphine HP®25, Sandoz, QC, Canada) and ropivacaine (1 mg/kg Naropin™ 0.2%, AstraZeneca Canada Inc., Mississauga, ON, Canada), administered 20 min prior to the surgery, followed by an 0.1 mg/kg epidural morphine sulfate injection given at 12, 24, and 36 h after extubation; 3) a subcutaneous (SC) tolfenamic acid injection (4 mg/kg Tolfedine™ 4%, Vetoquinol Inc., Lure, France) administered 1 h prior to the surgery and repeated after 24 and 48 h; and 4) an oral administration of tramadol (10 mg/kg, V1002, Vetoquinol Inc., Lure, France) started 3 to 2.5 h prior to T0 and repeated every 6 h until study completion. Group 3 dogs (n = 10) received 10 mg/kg of tramadol orally between 3 to 2.5 h prior to T0 and every 6 h until study completion. The dogs in Groups 1 and 3 also received a sham or placebo for the transdermal, epidural, and subcutaneous administrations. Rescue analgesia (0.1 mg/kg hydromorphone intravenously [IV], 25–50 µg/h fentanyl patch, and 4 mg/kg SC tolfenamic acid) was provided if the VAS score exceeded 6.5 (out of 10), and/or the 4A-VET score exceeded 11 (out of a total score of 18).

At the end of the experiment at T54, all dogs were euthanized using an IV overdose of sodium pentobarbital (EuthanylTM, Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada).

3.2.7.2 Anesthesia and Surgery Procedures

Anesthesia was induced with IV propofol to effect (up to 8 mg/kg, PropofloTM 1%, Abbott Animal Health, North Chicago, IL, USA). Lidocaine spray (10% w/w, LidodanTM, Odan Laboratories Ltd., Pointe-Claire, QC, Canada) was administered onto the glottis prior to tracheal intubation. Volatile anesthesia was initiated with isoflurane (AErraneTM, Baxter Corporation, Mississauga, ON, Canada) in oxygen (oxygen flow originally set at 200 ml/kg/min and isoflurane vaporizer set at 3%) using a Bain coaxial system. Then, volatile anesthesia was maintained using mechanical ventilation set at a respiratory rate between 8–12 breaths/min and using a peak inspiratory pressure of less than 20 cm H₂O to achieve a constant end-tidal carbon dioxide of approximately 40 mmHg. End-tidal isoflurane was maintained at 1.7%. Lactated Ringer's solution (Baxter Corporation, Toronto, ON, Canada) was IV-administered at a rate of 10 ml/kg/h throughout the anesthesia procedure. Cefazolin (25 mg/kg, NovopharmTM Toronto, ON, Canada) was IV-administered 1 hour prior to surgery and repeated 6 to 8 hours up to the end of the study.

The standardized trochleoplasty was performed in the right femorotibial joint. A skin incision of 8 cm was made at the anterolateral aspect of the femorotibial joint. After incision of the articular capsule and medial stabilization of the patella, a rectangular abrasion (2×1 cm dimensions) trochleoplasty was performed in the right femoral trochlea. Next, the arthrotomy was sutured using 3–0 polydioxane absorbable sutures for the

articular capsule, 3–0 polyglecaprone 25 polydioxanone absorbable sutures for the subcutaneous tissue, and 3–0 nylon sutures for the skin.

3.2.7.3 Video analysis of the spontaneous behaviors

We constructed a useful ethogram (Appendix 1) based on previous observations from pain research in the canine population (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000), personal observations and selection by a veterinary behaviorist (DFR). Behaviors were categorized using operational definitions. Categories were mutually exclusive and consisted of “Location in the kennel”, “Body position”, “Facial expression”, “Motor activity”, “Tail position”, and “Self-care”. The dogs were video-recorded during the same one-hour daylight period per session using a camera placed in front of the kennel. An automated video behavioral analysis system (The Observer® XT, Noldus Information Technology, Tracksys Ltd., Nottingham, United Kingdom) was used to collect expression of spontaneous dog behaviors. Ten percent of the videos were selected randomly and reviewed by two independent observers (DVL, DFR). The occurrence rate of spontaneous behaviors was quantified for each video-recording session.

3.2.7.4 Electrodermal activity

EDA measures sympathetic response and is associated with pain and stress behavior (Critchley, 2002; Storm, 2008)[51]. The portable device (Pain Gauge®, PHIS Inc., Dublin, OH, USA) converts electrical signals measured on the dry principal pad of the right thoracic limb to numerical values ranging from 0.1 (lowest value of stress and pain) to 9.9. Measurements of EDA were recorded in triplicate and averaged.

3.2.7.5 Pain scales

A VAS was used as a linear intensity pain scale with words that convey “no pain” (0-value) up to “worst pain” (100-value). The observer placed a mark along the line indicating the dog’s estimated pain intensity.

The composite 4A-VET pain scale recently tested by our group (Guillot al., 2011) was used again. It is composed of two sections. The first focuses on behavioral expressions of pain (4A-VETbeh) consisting of the “Global subjective appreciation”, “General attitude” and “Interactive behavior” subscales (Appendix 2). The second (4A-VETleg) includes orthopedic components of pain with “Gait evaluation”, “Reaction to handling of the surgical wound” and “Intensity of this reaction” subscales (Appendix 2). Each subscale scored pain intensity from 0 (no pain) to 3 (worst pain) and therefore, the total 4A-VET pain scale intensity ranged from 0 (no pain) to 18 (worst pain). Pain evaluation using the 4A-VET pain scale was performed in three successive and standardized phases: an initial, undisturbed observation of the dog, an interactive period of handling and encouragement and finally, a phase of systematic palpation of the incision and surrounding area of the operated leg.

3.2.7.6 Statistical analyses

The numbers and times of required rescue analgesia were described for each group. The data are reported as the median plus the 75th percentile, unless otherwise specified.

The intra-observer reliabilities of the pain scales and repeatability of EDA were calculated based on the –96 h and –5 h evaluations using a weighted Cohen's kappa coefficient and Spearman's rank correlations

(Brennan and Silman, 1992). The inter-observer reliabilities of the video-recording spontaneous behavior assessment were calculated based on the 10% random set of spontaneous behavior changes using an intraclass correlation coefficient tested on log-transformed (to fulfill homoscedasticity and Wilk-Shapiro test normality requirements) data (Berk, 1979). The internal consistency of the 4A-VET pain scale was assessed using a Cronbach's alpha coefficient (Streiner, 2003).

Pain assessment scores were modeled over time using GEE for repeated measures (Liang and Zeger, 1986; Ziegler et al., 1998). Data distribution was assessed and followed a negative binomial distribution (video analysis of spontaneous behavior), a Poisson distribution (VAS and 4A-VET pain scores and EDA measures) and a multinomial distribution (4A-VETbeh and 4A-VETleg scores). Model adequacy was verified using a thorough residual analysis (Stokes et al., 2000). For the negative binomial model, pairwise differences of mean estimates were expressed using estimated risk ratios along with a 95% confidence interval. To adjust for the multiple comparison tests performed, an adjusted-alpha level was set using the Bonferroni correction (original alpha-value divided by the number of comparisons of interest): 0.0041 for the video analysis of spontaneous behaviors (0.05/12), and 0.0015 for the EDA measurements and the pain scores (0.05/33).

To test the concurrent validity, multivariate GEE logistic regression models were used to assess the ability of each filmed spontaneous behavior to predict the pain scales scores. In addition, the regression models tested the following covariates: time, age, body weight and the use of rescue analgesia. The statistical significance of the above predictor variables and all of their possible dual interactions was tested with a stepwise-forward algorithm, using

a threshold of $p = 0.15$ for including these factors in the multivariate model and a threshold of $p = 0.20$ for their removal (Pan, 2001). A thorough residual analysis was performed for each model. The predictor variables showing clear non-linear relationships with the response variables were mathematically transformed to improve regression fit. Each final model was selected based on the best scatter of residuals over the regression line, coefficient of determination (R^2) and quasi-likelihood information criterion (Pan, 2001). The robust standard errors were calculated for all GEE estimates (Hanley et al., 2003). All analyses were conducted using a statistical software program (SAS system, version 9.2, SAS Institute Inc.); all tests were two-sided with an α threshold of 0.05.

3.2.8 Appendices

Appendix 1 – Ethogram of dog behaviors used for pain assessment.

Spontaneous behaviors were defined collegially by Pascale Rialland, Daphnée Veilleux-Lemieux, Diane Frank, Dominique Gauvin, and Eric Troncy. Behaviors were categorized using operational definitions. Categories were mutually exclusive and consisted of “Location in the kennel”, “Body position”, “Facial expression”, “Motor activity”, “Tail position”, and “Self-care”. The corresponding definitions are presented in the Appendix, as well as the Modifiers applicable to the different categories

Behavioral Class 1: Location in the kennel

| | |
|------------|--|
| Front cage | The dog is physically in the front part of the cage (first half of the cage) |
| Back cage | The dog is physically in the back of the cage (rear half of the cage). |

Behavioral Class 2: Body position

| | |
|------------------|-------------------------------|
| Stand | |
| Sit | |
| Laying down | |
| Other | None of the above |
| Stand 2 pelvic | Standing on pelvic limbs only |
| Body not visible | Unable to see. |

(Weight bearing, Laying side and Pelvic limb were described in modifiers)

Behavioral Class 3: Facial expression

| | |
|-------------|-------|
| Not panting | |
|-------------|-------|

Panting
 Silent Mouth is closed.....
 Bark Upward thrust of muzzle during apparent vocalization

Record once for each movement

Howling Muzzle directed dorsally, long-duration vocalization
 combining howl, yip, and bark in a continuous pattern

Yawn Mouth is fully opened with no vocalization.

If done >1x in a row, record as separate events.

Yipping.....

Whine Audible whining accompanied by long expiratory efforts.

Swallowing.....

Sniffing.....

Licking lips.....

Ears pulled back.....

Ears normal

Ears twitch Rapid movement of ears.....

Ears non-visible.....

Face non-visible.....

Behavioral Class 4: Motor activity

Immobilized.....

Jumps 2 paw or more not touching the ground.....

Walking.....

Running

Lame Animal is lame but has normal weight bearing.....

Shaking whole b Animal shaking whole body like wet dogs.....

Other None of the above.....

(Weight bearing and head position were described in modifiers).....

Behavioral Class 5: Tail position

Tail up Tail is up in the air, above the continuation of the spine

Tail down Tail is down, below the continuation of the spine....

Down tucked Tail down, tucked between the legs.....

(Tail positions were described in modifiers)

Behavioral Class 6: Self-Care

Scratch Repetitive pawing at body part with rear paw.....

Urinate

Defecate

Strain Time spent squatting unproductively.....

Vomit Physical expulsion of food or bile or unproductive attempts to do so

Careful position Dog carefully positioning itself in order to protect its wound...

Modifiers

Modifier Class 1: Weight bearing

Full Full weight bearing.....

Partial Partial weight bearing.....

Not at all No weight bearing at all.....

Trampling, thoracic Switch from one side to the other on thoracic limbs...

Trampling, pelvic Switch from one side to the other on pelvic limbs....

Modifier Class 2: Pelvic limb

Missing Pelvic limb.....

Normal Equal repartition of weight on rear limbs.....

Unequal on Right Unequal repartition of weight on rear limbs (more weight on the right limb)

Unequal on Left Unequal repartition of weight on rear limbs (more weight on the left limb)

Alternate Switching from right to left.....

Modifier Class 3: Laying side

Missing Laying side.....

Right Right lateral.....

Left Left lateral.....

Dorsal.....

Modifier Class 4: Head position

Missing Head position.....

Head up.....

Head down.....

Head tilting.....

Head vertical.....

Looking around.....

Head shaking.....

Not visible.....

Modifier Class 5: Tail movement

Missing Tail movement.....

Tail moving.....

Tail immobile

Appendix 2 – The 4A-VET pain scale.

The VETerinary Association for Animal Anesthesia and Analgesia (4A-VET) launched a composite multifactorial post-operative pain scale for dogs the 01/01/01. Originally created by Drs Patrick Verwaerde, Eric Troncy, Marc Gogny and Christophe Desbois, the 4A-VET pain scale had content validation by a panel of experts (Moens, Y.; Deschamps, J.-Y.; Cuvelliez, S.G., and Coppens, P.).

The canine 4A-VET post-operative pain scale is composed of two sections. The first focuses on behavioral expressions of pain (4A-VETbeh) consisting of the “Global subjective appreciation”, “General attitude” and “Interactive behavior” subscales. The second (4A-VETleg) includes orthopedic components of pain with “Gait evaluation”, “Reaction to handling of the surgical wound” and “Intensity of this reaction” subscales. Each subscale scores pain intensity from 0 (no pain) to 3 (worst pain) and therefore, the total 4A-VET pain scale intensity ranged from 0 (no pain) to 18 (worst pain).

The modified 4A-VET pain scale

| Parameter | Definition | Score |
|--|--|-------|
| Global subjective appreciation | No pain | 0 |
| | Light to moderate pain | 1 |
| | Moderate to severe pain | 2 |
| | Intolerable pain | 3 |
| General attitude | Among the following clinical signs, how many are present? Respiratory modification, moaning, hunched back, stays immobile in antalgic posture, animal agitated or depressed, appetite decreased, and looks at, gnaws or licks wound | |
| | No sign present | 0 |
| | 1 sign only | 1 |
| | 2 to 4 signs present | 2 |
| | 5 and more are present | 3 |
| Interactive behavior | Animal is alert and responds to voice and touch | 0 |
| | Responds timidly | 1 |
| | Does not respond immediately | 2 |
| | Does not respond or responds with aggressiveness | 3 |
| Gait evaluation | Normal use of limb | 0 |
| | Limping but limb is used when walking | 1 |
| | Limb used only at rest | 2 |
| | No use of limb | 3 |
| Reaction to the surgical wound palpation | No visible or audible reaction after 4 palpations | 0 |
| | Visible or audible reaction at the 4 th palpation | 1 |
| | Visible or audible reaction at the 2 nd and 3 rd palpation | 2 |
| | Visible or audible reaction at the 1 st palpation | 3 |
| Intensity of the reaction | No response | 0 |
| | Answers slightly, tries to withdraw itself | 1 |
| | Turns the head or vocalizes | 2 |
| | Animal tries to flee or attack or is not assessable | 3 |

Total score : _____ / 18

3.2.9 Acknowledgments

The authors thank Dr. Guy Beauchamp for his assistance in statistical analysis.

3.2.10 Funding Statement

This study was supported in part by a grant from Vétquinol Laboratories, Lure, France (<http://www.vetoquinol.fr/>); an ongoing New Opportunities Fund grant from the Canada Foundation for Innovation (#9483) for the pain/function equipment (<http://www.innovation.ca>); a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#327158-2008) as operating fund for pain biomarkers (<http://www.nserc-crnsng.gc.ca>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

3.2.11 Author contributions

PRI contributed to study design, carried out the statistical analysis and interpretation of data, and drafted the manuscript. SAU contributed to study design, performed the experiments, and participated in both the interpretation of data and the manuscript drafting. MGU and JDC contributed to statistical analysis and critical review of the manuscript. DVL performed the experiments and participated in the analysis and interpretation of data from video-automated behaviour recording, as well as in the manuscript drafting. DFR contributed to the design, analysis and interpretation of data from video-automated behaviour recording, and participated in the manuscript drafting. MKL contributed to the analysis and interpretation of data from video-automated behaviour recording, and participated in the manuscript drafting.

DGA contributed to reagents/materials/analysis tools, to the management and interpretation of data and revised the manuscript. ETR conceived the study, elaborated the design, managed the experiments, contributed to the pain and functional evaluation, collecting of the data, sampling tissues, interpreted the data, and drafted and revised the manuscript. He takes the responsibility for the integrity of the work as a whole. All authors read and approved the contents of this final version of the manuscript.

3.2.12 References

- Berk RA (1979). Generalizability of behavioral observations: a clarification of interobserver agreement and interobserver reliability. *Am J Ment Defic* 83(5): 460-472.
- Borer LR, Peel JE, Seewald W, Schawalder P, Spreng DE (2003). Effect of carprofen, etodolac, meloxicam, or butorphanol in dogs with induced acute synovitis. *Am J Vet Res* 64(11): 1429-1437.
- Brennan P, Silman A (1992). Statistical methods for assessing observer variability in clinical measures. *BMJ* 304(6840): 1491-1494.
- Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM (2005). Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin* 23(1): 1-20.
- Budsberg SC, Torres BT, Zwijnenberg RJ, Eppler CM, Clark JD, Cathcart CJ, Reynolds LR, Al-Nadaf S (2011). Effect of perzinfotel and a proprietary phospholipase A2 inhibitor on kinetic gait and subjective lameness scores in dogs with sodium urate-induced synovitis. *Am J Vet Res* 72(6): 757-763.
- Buvanendran A, Kroin JS, Kari MR, Tuman KJ (2008). A new knee surgery model in rats to evaluate functional measures of postoperative pain. *Anesth Analg* 107(1): 300-308.

- Cohen LL, La Greca AM, Blount RL, Kazak AE, Holmbeck GN, Lemanek KL (2008). Introduction to special issue: evidence-based assessment in pediatric psychology. *J Pediatr Psychol* 33(9): 911-915.
- Critchley HD (2002). Electrodermal responses: what happens in the brain. *Neuroscientist* 8(2): 132-142.
- Dzikiti TB, Joubert KE, Venter LJ, Dzikiti LN (2006). Comparison of morphine and carprofen administered alone or in combination for analgesia in dogs undergoing ovariohysterectomy. *J S Afr Vet Assoc* 77(3): 120-126.
- Firth AM, Haldane SL (1999). Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 214(5): 651-659.
- Fox SM, Mellor DJ, Stafford KJ, Lowoko CRO, Hodge H (2000). The effects of ovariohysterectomy plus different combinations of halothane anaesthesia and butorphanol analgesia on behaviour in the bitch. *Res Vet Sci* 68(3): 265-274.
- Gruet P, Seewald W, King JN (2011). Evaluation of subcutaneous and oral administration of robenacoxib and meloxicam for the treatment of acute pain and inflammation associated with orthopedic surgery in dogs. *Am J Vet Res* 72(2): 184-193.
- Guedes AG, Papich MG, Rude EP, Rider MA (2007). Pharmacokinetics and physiological effects of two intravenous infusion rates of morphine in conscious dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 30(3): 224-233.
- Guillot M, Riolland P, Nadeau MÈ, del Castillo JRE, Gauvin D, Troncy E (2011). Pain induced by a minor medical procedure (bone marrow aspiration) in dogs: comparison of pain scales in a pilot study. *J Vet Intern Med* 25(5): 1050-1056.
- Hadjistavropoulos T, Craig KD (2002). A theoretical framework for understanding self-report and observational measures of pain: a communications model. *Behav Res Ther* 40(5): 551-570.

- Hanley JA, Negassa A, Edwardes MDd, Forrester JE (2003). Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 157(4): 364-375.
- Hazewinkel HA, van den Brom WE, Theijse LF, Pollmeier M, Hanson PD (2003). Reduced dosage of ketoprofen for the short-term and long-term treatment of joint pain in dogs. *Vet Rec* 152(1): 11-14.
- Hazewinkel HAW, van den Brom WE, Theyse LFH, Pollmeier M, Hanson PD (2008). Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urate crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. *Res Vet Sci* 84(1): 74-79.
- Hoelzler MG, Millis DL, Francis DA, Weigel JP (2004). Results of arthroscopic versus open arthrotomy for surgical management of cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Vet Surg* 33(2): 146-153.
- Holton L, Pawson P, Nolan A, Reid J, Scott EM (2001). Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. *Vet Rec* 148(17): 525-531.
- Horstman CL, Conzemius MG, Evans R, Gordon WJ (2004). Assessing the efficacy of perioperative oral carprofen after cranial cruciate surgery using noninvasive, objective pressure platform gait analysis. *Vet Surg* 33(3): 286-292.
- Hugonnard M, Leblond A, Keroack S, Cadore J-L, Troncy E (2004). Attitudes and concerns of French veterinarians towards pain and analgesia in dogs and cats. *Vet Anaesth Analg* 31(3): 154-163.
- Ji Z, Ma Y, Li W, Li X, Zhao G, Yun Z, Qian J, Fan Q (2012). The healing process of intracorporeally and in Situ devitalized distal femur by microwave in a dog model and its mechanical properties *in vitro*. *PLoS One* 7(1): e30505.

- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: reporting in vivo experiments -- the ARRIVE guidelines. *B J Pharmacol* 160(7): 1577-1579.
- Kona-Boun J-J, Cuvellez S, Troncy E (2006). Evaluation of epidural administration of morphine or morphine and bupivacaine for postoperative analgesia after premedication with an opioid analgesic and orthopedic surgery in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 229(7): 1103-1112.
- Kyles AE, Hardie EM, Hansen BD, Papich MG (1998). Comparison of transdermal fentanyl and intramuscular oxymorphone on post-operative behaviour after ovariohysterectomy in dogs. *Res Vet Sci* 65(3): 245-251.
- Laboissière B (2006). Statistical validation of 4A-VET'S postoperative pain scale in dogs and cats. Nantes, École Nationale Vétérinaire de Nantes. Thesis: 229.
- Lafuente MP, Franch J, Durall I, Diaz-Bertrana MC, Marquez RM (2005). Comparison between meloxicam and transdermally administered fentanyl for treatment of postoperative pain in dogs undergoing osteotomy of the tibia and fibula and placement of a uniplanar external distraction device. *J Am Vet Med Assoc* 227(11): 1768-1774.
- Landis JR, Koch GG (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33(1): 159-174.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Meth* 7(6): 447-449.
- Liang K-Y, Zeger SL (1986). Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73(1): 13-22.

- Lipscomb VJ, Pead MJ, Muir P, AliAbadi FS, Lees P (2002). Clinical efficacy and pharmacokinetics of carprofen in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 150(22): 684-689.
- Liska WD, Doyle ND (2009). Canine total knee replacement: surgical technique and one-year outcome. *Vet Surg* 38(5): 568-582.
- Mann KA, Miller MA, Khorasani M, Townsend KL, Allen MJ (2012). The dog as a preclinical model to evaluate interface morphology and micro-motion in cemented total knee replacement. *Vet Comp Orthop Traumatol* 25(1): 1-10
- Marucio RL, Luna SPL, Neto FJT, Minto BW, Hatschbach E (2008). Postoperative analgesic effects of epidural administration of neostigmine alone or in combination with morphine in ovariohysterectomized dogs. *Am J Vet Res* 69(7): 854-860.
- Melzack R, Wall P (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150(699): 971-979.
- Moreau M, Rialland P, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, Caron J, Frank D, Lussier B, del Castillo JRE, Beauchamp G, Gauvin D, Bertaim T, Thibaud D, Troncy E (2011). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 13(3): R98.
- Oosterlinck M, Bosmans T, Gasthuys F, Polis I, Van Ryssen B, Dewulf J, Pille F (2011). Accuracy of pressure plate kinetic asymmetry indices and their correlation with visual gait assessment scores in lame and non lame dogs. *Am J Vet Res* 72(6): 820-825.
- Pacharinsak C, Greene SA, Keegan RD, Kalivas PW (2003). Postoperative analgesia in dogs receiving epidural morphine plus medetomidine. *J Vet Pharmacol Ther* 26(1): 71-77.
- Pan W (2001). Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics* 57(1): 120-115.

- Punke JP, Speas AL, Reynolds LR, Claxton RF, Budsberg SC (2007). Kinetic gait and subjective analysis of the effects of a tachykinin receptor antagonist in dogs with sodium urate-induced synovitis. *Am J Vet Res* 68(7): 704-708.
- Quessy SN (2010). The challenges of translational research for analgesics: the state of knowledge needs upgrading and some uncomfortable deficiencies remain to be urgently addressed. *J Pain* 11(7): 698-700.
- Quinn MM, Keuler NS, Lu Y, Faria ML, Muir P, Markel MD (2007). Evaluation of agreement between numerical rating scales, visual analogue scoring scales, and force plate gait analysis in dogs. *Vet Surg* 36(4): 360-367.
- Reid J, Nolan AM, Hughes JML, Lascelles D, Pawson P, Scott EM (2007). Development of the short-form Glasgow composite measure pain scale (CMPS-SF) and derivation of an analgesic intervention score. *Anim Welf* 16: 97-104.
- Richardson CA, Niel L, Leach MC, Flecknell PA (2007). Evaluation of the efficacy of a novel electronic pain assessment device, the Pain Gauge, for measuring postoperative pain in rats. *Lab Anim* 41(1): 46-54.
- Roughan JV, Flecknell PA (2006). Training in behaviour-based post-operative pain scoring in rats - an evaluation based on improved recognition of analgesic requirements. *Appl Anim Behav Sci* 96(3/4): 327-342.
- Schumacher H, Phelps P, Agudelo C (1974). Urate crystal induced inflammation in dog joints: sequence of synovial changes. *J Rheumatol* 1: 102-113.
- Shih AC, Robertson S, Isaza N, Pablo L, Davies W (2008). Comparison between analgesic effects of buprenorphine, carprofen, and buprenorphine with carprofen for canine ovariohysterectomy. *Vet Anaesth Analg* 35(1): 69-79.
- Stokes ME, Davis CS, Koch GG (2000). *Categorical data analysis using the SAS system*. Cary, N.C, SAS Publishing Inc.

- Storm H (2008). Changes in skin conductance as a tool to monitor nociceptive stimulation and pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 21(6): 796-804.
- Streiner DL, Norman GR (2003). *Health measurement scales: a practical guide to their development and use*. New York, Oxford University Press.
- Väisänen MA-M, Tuomikoski-Alin SK, Brodbelt DC, Vainio OM (2008). Opinions of Finnish small animal owners about surgery and pain management in small animals. *J Small Anim Pract* 49(12): 626–632.
- Valtolina C, Robben JH, Uilenreef J, Murrell JC, C. John B, McKusick A, Hellebrekers LJ (2009). Clinical evaluation of the efficacy and safety of a constant rate infusion of dexmedetomidine for postoperative pain management in dogs. *Vet Anaesth Analg* 36(4): 369-383.
- Vettorato E, Zonca A, Isola M, Villa R, Gallo M, Ravasio G, Beccaglia M, Montesissa C, Cagnardi P (2010). Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. *Vet J* 183(3): 310-315.
- Waxman AS, Robinson DA, Evans RB, Hulse DA, Innes JF, Conzemius MG (2008). Relationship Between Objective and Subjective Assessment of Limb Function in Normal Dogs with an Experimentally Induced Lameness. *Vet Surg* 37(3): 241-246.
- Williams VM, Lascelles BD, Robson MC (2005). Current attitudes to, and use of, peri-operative analgesia in dogs and cats by veterinarians in New Zealand. *N Z Vet J* 53(3): 193-202.
- Xu J, Brennan TJ (2009). Comparison of skin incision vs. skin plus deep tissue incision on ongoing pain and spontaneous activity in dorsal horn neurons. *Pain* 144(3): 329-339.
- Ziegler A, Kastner C, Blettner M (1998). The generalised estimating equations: an annotated bibliography. *Biom J* 40(2): 115-139.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2): 109-110.

3.2.13 Tables

Table I - Interobserver reliability of the video-analysis.

| Spontaneous behavior | Number | Number | Mean | Mean | ICC |
|--|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------|
| Observer | #1 | #2 | (SD) | (SD) | |
| | | | #1 | #2 | |
| Standing with no weight bearing | 6 | 4 | 4.3 (3.6) | 6.7 (3.6) | 0.74 |
| Walking with full weight bearing | 4 | 3 | 136.2 (141.9) | 54.6 (30.1) | 0.99 |
| Standing with full weight bearing | 4 | 3 | 83.0 (105.8) | 67.0 (93.5) | 0.97 |
| Sitting normal with equal weight on limbs | 4 | 3 | 11.7 (15.0) | 7.3 (3.5) | 0.84 |
| Immobile with head down | 4 | 3 | 49.5 (24.7) | 17.0 (10.0) | 0.52 |
| Silent | 5 | 5 | 63.2 (49.0) | 46.8 (48.7) | 0.01 |
| Howling | 5 | 5 | 63.4 (51.8) | 24.0 (41.5) | 0.50 |
| Sniffing | 8 | 8 | 182.1 (138.8) | 87.0 (47.7) | 0.98 |
| Immobile with head up | 8 | 8 | 167.1 (123.2) | 31.3 (17.3) | 0.91 |
| Immobile while looking around | 8 | 8 | 32.2 (23.7) | 34.0 (21.07) | 0.39 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|---|---|----------------|----------------|-------------|
| Licking lips | 6 | 6 | 50.8 (51.9) | 19.8 (20.1) | 0.92 |
| Ears twitching | 6 | 5 | 6.1 (3.6) | 4.6 (2.6) | 0.01 |
| Ears normal | 8 | 8 | 69.1 (47.8) | 25.5 (15.5) | 0.87 |
| Dog in front of the kennel | 8 | 8 | 34.7 (28.2) | 36.3 (30.5) | 0.99 |

Data presents the number of videotapes (Number) for which the behaviour was recorded by both independent observers (#1 and #2) blinded to treatment groups for 10% of all videos (n = 8). Mean (SD) of the occurrence rate is presented for each observer (#1 and #2). Intraclass correlation coefficients (ICC) were calculated from a set of 10% randomized videotapes.

Table II- Wald statistics for Type 3 GEE¹ analyses of video-analysis.

| Spontaneous behavior | Time ChiSq (p) | Group ChiSq (p) | Group × Time ChiSq (p) |
|---|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Standing with no weight bearing | 198.91 (<.0001) | 35.8 (<.0001) | 5.77 (0.21) |
| Walking with full weight bearing | 920.21 (<.0001) | 16.15 (0.0003) | 33.57 (<.0001) |
| <i>Standing with full weight bearing</i> | <i>1692.66 (<.0001)</i> | <i>4.27 (0.12)</i> | <i>11.47 (0.022)</i> |
| Sitting normal with equal weight on limbs | 996.06 (<.0001) | 2.23 (0.33) | 5.36 (0.25) |
| Immobile with head down | 3214.42 (<.0001) | 4.72 (0.09) | 3.61 (0.46) |
| Howling | 1800.35 (<.0001) | 7.1 (0.03) | 170.58 (<.0001) |
| Sniffing | 4141.17 (<.0001) | 19.74 (<.0001) | 9.49 (0.05) |
| Immobile with head up | 4564.48 (<.0001) | 10.34 (0.006) | 6.4 (0.17) |
| Licking lips | 834.88 (<.0001) | 17.76 (0.0001) | 29.71 (<.0001) |
| Ears normal | 1485.69 (<.0001) | 3.05 (0.22) | 2.49 (0.65) |
| <i>Dog in front of the kennel</i> | <i>2745.23 (<.0001)</i> | <i>0.75 (0.69)</i> | <i>36.02 (<.0001)</i> |

¹Generalized estimating equation. For each behaviour, the results of GEE analysis are presented as the Chi-square result (ChiSq) and the p-value (p) of the main effect for Time, Group and the Group × Time interaction. Significant main effect for Group × Time interaction is presented in bold. Italics for the behaviours indicated in bold is indicative of no significant Group effect.

Table III - Descriptive statistics of spontaneous behavior during video-analysis.

| Spontaneous behavior | Group | T-96 | | T24 | | T48 | |
|-----------------------------------|-------|-----------------|------------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|
| | | Freq (%) | Med (min-max) | Freq (%) | Med (min-max) | Freq (%) | Med (min-max) |
| Walking with full weight bearing | | | | | | | |
| | 1 | 186 (40-308) | 16. <i>9^x</i> | 0 (0-2) | 5 ^a | 64 (0-228) | 10. 78 |
| | 2 | 139 (9-321) | 27. <i>70^x</i> | 0 (0-3) | 2 ^a | 1 (0-109) | 6.9 4 |
| | 3 | 250 (81-332) | 24. <i>25^x</i> | 3 (0-117) | <i>b</i> | 6 (0-145) | 4.8 <i>1</i> |
| Standing with full weight bearing | | | | | | | |
| | 1 | 52 (7-128) | 6.0 <i>2^x</i> | 4 (0-25) | 7 | 22 (0-103) | 3.6 9 |
| | 2 | 45 (5-211) | 11. <i>84^x</i> | 4 (0-4) | 8 | 3 (0-3) | 1.6 3 |

| | | | | | | |
|----------------------------|----------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------|-------------------|
| 2 | 10 (2-116) | 5.80 ^x | 1 (0-1) | 0.12 ^b | 3 (0-5) | 0.63 ^b |
| 3 | 10 (7-11) | 2.80 ^x | 7 (0-30) | 0.96 ^a | 18 (0-68) | 2.54 ^a |
| Dog in front of the kennel | | | | | | |
| 1 | 28 (6-130) | 3.98 | 9 (2-72) | 2.12 ^a | 23 (4-57) | 3.47 |
| 2 | 27 (2-181) | 10.68 ^x | 2 (1-12) | 0.84 ^b | 18 (1-85) | 7.63 |
| 3 | 78 (12-219) | 9.32 ^x | 7 (1-55) | 1.79 ^{ab} | 21 (1-75) | 2.20 |

Data are presented as the median (Med), minimum (min), maximum (max) and relative frequency (Freq) in percentage (%) of spontaneous behaviour by group and time (T) -96, 24 and 48 hours. Superscript case (x) indicate significant difference when -96 h is compared to 24 h; At each time point, different letters (higher case (a) or (b)) indicate significantly different values among treatment groups. Significant differences are presented in bold. Bonferroni-corrected alpha level was of 0.0041.

3.2.14 Figure legends

Figure 1 - Electrodermal activity. EDA (no unit) by group over time. Data are presented as the median and 75th percentile for groups of n = 5 to 10 dogs over time. At each time point, different letters (higher case (a) or (b)) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected alpha level was of 0.0015.

Figure 2 - Pain scales. A) Visual analog scale, B) the 4A-VET pain scale, C) 4A-VETbeh subscale and D) 4A-VETleg subscale by group over time. Data are presented as the median and 75th percentile for groups of n = 5 to 10 dogs at each time points. At each time point, different letters (higher case (a) or (b)) indicate significantly different values among treatment groups. Bonferroni-corrected alpha level was of 0.0015.

3.2.15 Figures

Figure 1

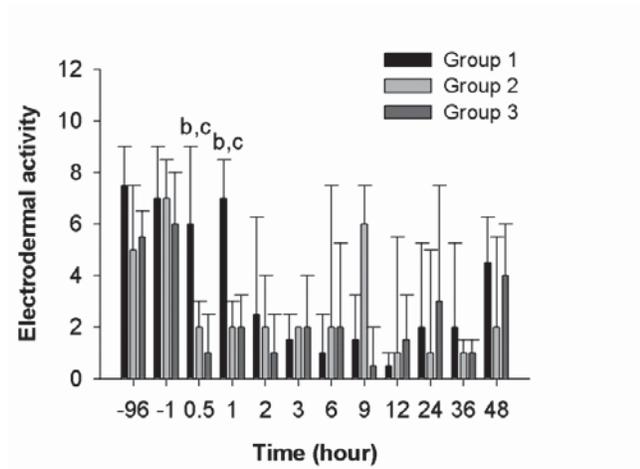
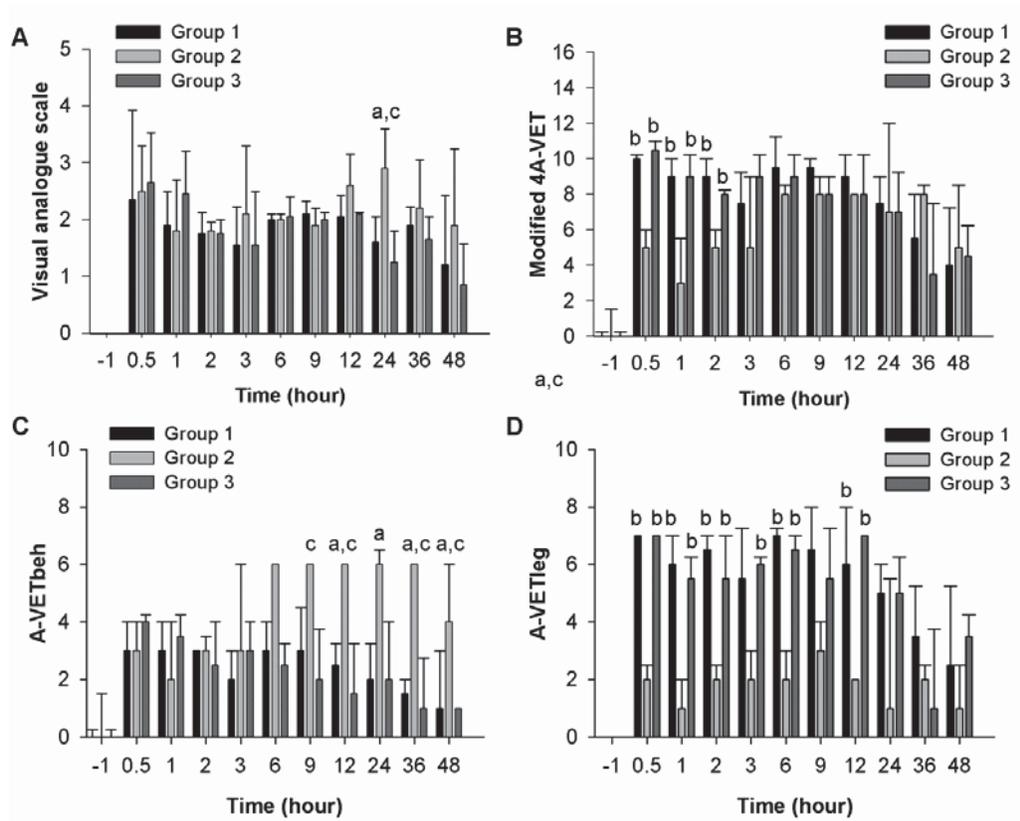


Figure 2



3.2.16 Données additionnelles sur le développement de l'éthogramme en vidéo-analyse

La recherche posait la question de l'expression de la douleur suivant une lésion chirurgicale localisée au niveau du genou. Les comportements de douleur listés dans différentes échelle de douleur suivant une liaison articulaire (Vasseur et al., 1995; Budsberg et al., 2002; Bosmans et al., 2007) ont guidé la sélection préliminaire des items. Une étude pilote sur la standardisation de la trochléoplastie montrait que le non appui et les boiteries des chiens suivant la chirurgie étaient des comportements affectés par le modèle.

Un éthogramme a été développé par la comportementaliste (DF). Les critères de troubles de la locomotion et de la boiterie ont été inclus en lien avec les observations faites durant l'étude pilote. L'éthogramme composé des 85 critères comportementaux a été développé, défini et révisé selon les mêmes conditions que l'étude bovine afin de vérifier la clarté des items et des définitions associées. La procédure d'enregistrement se faisait en condition de laboratoire. Un codeur (DVL), naïve vis-à-vis du protocole de l'étude, est une vétérinaire expérimentée dans l'évaluation clinique des animaux. La formation du codeur s'est opérée par un apprentissage en visionnant et en codant les comportements de plusieurs films. La fiabilité inter-observateur été réalisé entre la comportementaliste (DF) et le codeur (DVL) (données publiées).

L'analyse exploratoire descriptive des résultats (box plot et histogramme) montrait que certains comportements étaient peu fréquents. Un processus de sélection consensuel a été mis en place pour permettre l'analyse des données. En premier lieu, tout comportement compté moins de 10 fois sur

les trois temps de mesure en moyenne par groupe n'était pas analysé. Sur les 72 comportements, 57 comportements répondaient à cette condition. Une analyse exploratoire des données, à l'aide d'une analyse de la variance à mesure répétée appliquée à chaque comportement, a montré que seuls 14 comportements se différençaient dans le temps pour le groupe 1 et le groupe 2. Ces comportements ont été utilisés pour tester l'hypothèse d'une différence d'expression de la douleur chez des chiens appartenant à des groupes d'analgésie différente.

3.3 Article 3

Rialland P ^{a,b}, Otis C ^a, Moreau M ^{a,b}, Pelletier J-P ^b, Martel-Pelletier J ^b, Beaudry F ^{a,b}, del Castillo JRE ^{a,b}, Bertaim T ^c, Gauvin D ^{a,b}, Troncy E ^{a,b}.
Association between sensitisation and pain related behaviours in an experimental canine model of osteoarthritis.

(Article soumis le 10 décembre 2013 pour publication auprès de la revue *PAIN* – Facteur.d’impact sur 5 ans de 6,125)

^a Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec (GREPAQ), Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine – Université de Montréal, 1500 des vétérinaires St., St.-Hyacinthe (QC), J2S 7C6 Canada.

^b Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM), Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal (QC), H2L 4M1 Canada.

^c R&D Exploratory Clinics, CEVA Santé Animale, 10 av. de la Ballastière, Libourne, 33500 France.

* Correspondence to: Pr Eric Troncy, Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine – Université de Montréal, 1500 des vétérinaires St., St.-Hyacinthe.(QC), J2S 7C6 Canada.

3.3.1 Contexte de la recherche

L'étude de recherche chez le bovin (étude #1) évaluait la douleur aiguë et chronique en utilisant de multiples mesures. Cette étude #1 a permis de faire un tri préliminaire des méthodes qui indiquent la douleur et de séparer des mesures sensibles à la douleur aiguë de celles sensibles à la douleur chronique. Au cours de l'étude de douleur bovin, des bio-marqueurs contenus dans le liquide cébrospinal semblaient des indicateurs valides de la douleur, notamment la douleur chronique. Le dosage de bio-marqueurs et les tests de sensibilisation mécanique chez le bovin montrent une modulation centrale de la douleur observable durant la phase chronique de la douleur.

Les études de la vache et de la douleur post-chirurgicale au niveau de l'articulation chez le chien (étude #2) montrent la supériorité de la vidéo-analyse pour l'évaluation des changements de comportement. En effet, la vidéo-analyse a permis d'identifier des comportements spécifiques du modèle de douleur (augmentation de comportement anormal et diminution de comportements normaux en lien avec la cause de douleur du modèle) et de différencier les groupes de traitements. La capacité de distinguer des groupes de traitements connus et la capacité de différencier des sujets avant et après l'induction de douleur, suggèrent que la vidéo-analyse est respectivement performante et pertinente pour l'étude de la douleur animale.

À l'inverse, les échelles de douleur, spécifiques de leurs modèles et de l'espèce ne sont pas valides. L'AED différencie difficilement la douleur en phase aiguë de la douleur (études #1 et #2). Ce défaut de performance supporte peu la validité des mesures des échelles de douleur et l'AED lors de douleur aiguë. Néanmoins, les performances de ces mesures n'ont pas été évaluées lors de douleur chronique.

Également dans le contexte de validation, il était observé dans l'étude #1 et confirmé dans l'étude #2, que l'effet sédatif des morphiniques perturbait les évaluations de la douleur. L'étude #3 se place dans un cadre différent car le construit se base sur l'évaluation de la validité des mesures de la douleur par comparaison des groupes de traitement pour lesquels il n'y a pas d'administration de substance sédatrice. Ainsi, pour cette étude, nous faisons l'hypothèse que des chiens arthrosiques traités avec du tiludronate présentaient moins de signes de douleur que ceux non traités au tiludronate sur une période de 56 jours.

L'étude #3 se place dans la continuité de l'étude de validité de multiples mesures en utilisant des mesures communes entre les études #1 et 2. Également l'étude #3 est une étude de douleur chronique d'origine articulaire chez le chien ce qui le distingue de l'étude de douleur articulaire aigu (#2). L'objectif principal est d'évaluer la fiabilité et les validités des mesures de la douleur (validité de construit et validité de critères) dans un contexte de douleur chronique d'origine articulaire chez le chien. Les objectifs secondaires sont

- de vérifier si ces mesures présentent des qualités métriques satisfaisantes en l'absence d'analgésique à effet sédatif
- de vérifier que les changements des mesures sont expliqués par les changements de sensibilisation considérée comme une mesure de référence de la réponse neurophysiologique (test de sensibilisation et dosage de bio-marqueur cérébro-spinaux)
- de confirmer les associations entre les mesures de la douleur et les mesures de référence de la boiterie (analyse cinétique et vidéo-analyse)

- de vérifier si les mesures étudiées présentent des fiabilités et des validités cohérentes avec les résultats des études #1 et 2 et de définir quelles mesures pourraient être une mesure de référence pour la douleur articulaire ou la douleur en général en comparant les performances de mesures
- d'étudier une échelle développée pour l'étude de la douleur causée par l'arthrose (étude pilote pour la mesure)

3.3.2 Résumé

La douleur est le principal signe clinique de la maladie arthrosique chez le chien. La mesure de la sensibilisation nociceptive n'est pas (encore) très répandue à la différence de l'étude cinétique de la démarche chez les modèles expérimentaux d'arthrose. De plus, il n'y a pas de lien établi entre les changements neurophysiologiques, les modifications de la fonction locomotrice (mesures biomécaniques et mesure de l'activité motrice) et les changements de comportements causés par l'arthrose.

Les deux études précédentes (#1 et #2) ont révélé l'intérêt de la vidéo-analyse, et à un moindre degré, la mesure de l'AED pour l'étude de la douleur. Également, les effets sédatifs des agents analgésiques perturbaient le processus de validation des méthodes. Sur le modèle induit chirurgicalement d'arthrose canine, l'étude avait pour objectif d'évaluer et de valider différentes méthodes. Sur 16 chiens, des mesures objectives du comportement à l'aide de la vidéo-analyse, le PFV, l'activité motrice, des évaluations subjectives à l'aide de trois échelles de douleur STAPS (*Standardized Technician Arthritis Pain Scale*), SVAPS (*Standardized Veterinarian Arthritis Pain Scale*) et une échelle visuelle analogue (EVA) ainsi que l'activité électrodermique du derme (AED) ont été quantifiés au Baseline (J-

7), 28 et 56 jours après la section du ligament croisé crânial. À titre de marqueurs de la sensibilisation centrale, des neuropeptides spinaux spécifiques (substance P et transthyréline) ont été quantifiés à J56. Les seuils de retrait électriques sur le genou et la queue reflétaient respectivement les tests sensoriels quantitatifs (QST) de sensibilisation périphérique et centrale. Les effets de l'administration du véhicule-placebo (n=8) ont été comparés à ceux produits par une administration de tiludronate (2 mg/kg SC, toutes les 2 semaines, démarrant à J0), un agent anti-ostéoclastique visant la résorption osseuse dans l'arthrose. La validation reposait sur l'analyse des associations entre la sensibilisation et les mesures de la douleur. Pour cette étude, nous faisons l'hypothèse que des chiens arthrosiques traités avec du tiludronate présentaient moins de signes de douleur que ceux non traités au tiludronate sur une période de 56 jours.

Comparés au tiludronate à J56, les chiens du groupe contrôle placebo ont montré une concentration spinale augmentée de substance P ($p=0,01$), et une baisse concomitante de transthyréline ($p=0.02$), et (en comparaison au Baseline) ont démontré une sensibilisation QST périphérique et centrale (non présente pour les chiens du groupe tiludronate). La sensibilisation QST centrale était reliée à une diminution du PFV, à une augmentation de 'la marche avec plein appui de la patte opérée', de l'activité motrice et de l'AED. L'inclusion du prédicteur 'sensibilisation QST centrale' dans la modélisation statistique augmentait l'effet traitement du tiludronate sur plusieurs critères, dont PFV, 'la marche avec plein appui de la patte opérée' et l'AED, permettant d'identifier des mesures ayant un lien avec la douleur centralisée.

Synthèse – L'analyse des associations permet de vérifier le lien entre les mesures de la sensibilisation et les mesures des comportements et physiologiques. Le PFV, la vidéo-analyse et l'AED différenciaient les

groupes de traitement et étaient associés à la sensibilisation centrale de façon significative. Les résultats suggèrent que la mesure de la sensibilisation permet de mieux comprendre les liens entre la douleur et les mesures comportementales et physiologiques utilisées pour quantifier la douleur. Nous suggérons que PVF, ‘la marche avec plein appui de la patte opérée’, et l’AED seraient plus affectés par le niveau d’atteinte d’origine neurologique (la sensibilisation à la douleur induite et entretenue par les lésions arthrosiques dans une relation bilatérale).

3.3.3 Abstract

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

The relationship between several behavioural outcome measures and occurrence of pain sensitisation improved detection of treatment effect in a preclinical canine OA pain model.

3.3.4 Introduction

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

The instability-induced joint disease in animals best models the structural changes that develop in human patients with post-traumatic OA (Little and Hunter, 2013). Biomechanical, histological and macroscopic structural (Proffen et al., 2012), genomic, and molecular (Lorenz et al., 2005) similarities were reported between human OA and the dog surgical cranial cruciate ligament transection (CCLT) model of OA, as well as a structure – function (pain) relationship translated from the dog CCLT model to the human OA pain condition. Similar to reports in human OA patients (Torres et al., 2006; Zhang et al., 2010; Yusuf et al., 2011), pain in CCLT-dog model, indirectly assessed by kinetics, evolved with bone marrow lesions modulation, as well as progression of osteophyte, effusion / synovitis, and meniscal insults (Moreau et al., 2013). At variance with the preclinical rodent models, the dog CCLT model of OA offers an available translational predictability in therapy response with regards to the natural OA disease (and lack of effective treatment) both in dogs (Moreau et al., 2013) and in humans (Mogil, 2009). For example, structural and functional benefits of disease

modifying strategies have been translated with strontium ranelate from the dog CCLT model (Pelletier et al., 2013) to the human OA patient (Reginster et al., 2013). This was also the case for the metalloproteinase inhibitor doxycycline, the viscosupplementation via local hyaluronan, the anti-resorptive agents such as bisphosphonates, the anti-inflammatory properties of diacerhein, licofelone and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (for references, see (Moreau et al., 2013)). No other preclinical animal OA model presents a better translational predictability record.

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

In experimental OA models, subchondral sclerosis does not lead to progressive OA when there is no increased remodelling and bone loss at early-stage (Burr and Gallant, 2012). Interestingly, tiludronate, a bisphosphonate known to inhibit bone resorption, demonstrated a decrease in structural changes (Pelletier et al., 2011) and anti-inflammatory activity in the canine CCLT pain model (Moreau et al., 2011). Altogether, preventive

administration of tiludronate might influence both centralised pain concurrently to OA symptoms in the CCLT model.

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

3.3.5 Methods

3.3.5.1 Dogs and experimental design

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

Sixteen adult crossbred dogs (aged 2 to 3.5 years), 26 (3.4) kg, originating from an external source (Laka (1994), St-Basile-le-Grand, QC, Canada) and housed in ArthroLab Inc. (St-Basile-le-Grand, QC, Canada) facilities, were used for the study. Before inclusion, health status evaluation

included clinical examination, haematological and serum biochemical analyses, and radiography. The dogs were housed individually in a controlled room environment. Food was given once daily and removed overnight. Tap water (purified by filtration) was available to the animals ad libitum. The dogs were freely exercised in groups of 2 to 3 for 2 hours every weekday. During a 3-week period of acclimatization, the dogs were trained to trot over the floor mat-based plantar force measurement system.

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

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

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

3.3.5.2 Anaesthesia and CCLT surgery

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

3.3.5.3 Centralised pain evaluation

3.3.5.3.1 *Selected spinal cord neuropeptides*

Each frozen spinal cord section from the lumbar area (L3 to L7 section) was weighed and homogenized using a Tissue-Tearor following the addition of phosphate buffer saline solution 0.01 M at a ratio of 1:5 (v/v) and protease inhibitor cocktail (no P8340, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at the same ratio. The samples were sonicated for 20 min and 150 μ L of the homogenate was mixed with 150 μ L of acetonitrile to remove larger proteins. The samples were then vortexed and centrifuged at 12,000 g for 10 min. The supernatant (150 μ L) was transferred into an injection vial, and then spiked with 150 μ L of the internal standard solution. Vials were capped and vortexed at high speed prior to analysis. Selected spinal cord peptides, substance P (SP), and transthyretin (TTR), were identified based on full scan tandem mass spectrometry (MS/MS) spectra, and quantification was performed in selected reaction monitoring (SRM), and ELISA, respectively.

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

The high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) system included a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo Advantage Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Data were

acquired and analysed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA), and regression analyses were performed with PRISM (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve fitting module with an estimation of the goodness-of-fit. The calibration curves were constructed from the peak-area ratios of SP and corresponding analogue acetylated SP used as internal standard. The reaction was performed as previously described (Che and Fricker, 2002) and the bioanalytical SRM method as previously published (Pailleux et al., 2013).

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

3.3.5.3.2 *Electrical QST sensitisation*

As originally the therapeutic target of tiludronate was not expected to be anti-inflammatory, but bone remodelling, a mechanical QST looked less appropriate than an electrical QST to demonstrate a treatment effect on central sensitisation. Moreover, we expected the electrical stimulation to embrace all types (i.e., A β -, A δ - and C) as well as peptidergic (or not) nerve fibres at the level of the periostum as they have been recognised as playing an important role in controlling bone-associated nociception (Gronblad et al., 1984).

Electrical QST threshold was quantified following a ramped cutaneous electrical stimulus applied to the dogs at 2 different sites to test,

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

3.3.5.4 Behavioural data outcomes (gait analysis, VAS, STAPS, SVAPS, and video-analysis)

3.3.5.4.1 Gait analysis

In dogs, the use of a floor mat-based plantar force measurement system acquires limb loading and is defined as a quantitative measurement of gait function. For the right (CCL-deficient) hind limb, peak vertical force (PVF) was acquired while the dogs applied the limb on the Walkway® System (Tekscan, Inc., Boston, MA, USA) at a trotting velocity ranging from 1.9 to 2.2 meters/second. Velocity and acceleration (± 0.5 meter per second²) were ensured using a set of three photoelectric cells specially designed for this podobarometric device (LACIME; École de Technologie Supérieure, Montréal, QC, Canada). The gait acquisition window was 3 seconds with a sampling rate set at 44 hertz, producing a total of 132 frames. Raw PVF (kg)

data from the first 5 valid trials were obtained for each dog and later used for statistical purposes using body weight (BW) as a covariate (Boileau et al., 2010). Data were expressed as percentage of BW (%BW), as previously described (Moreau et al., 2011).

3.3.5.4.2 Other behavioural data outcomes (VAS, STAPS, SVAPS, and video-analysis)

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

The video-capture of behavioural changes in terms of body position and motor activities allows a non-invasive monitoring of pain-related functional disability and discomfort. Recording was performed at baseline and at week 8 only in the outdoor runs where the dogs were allowed to exercise. As previously described (Rialland et al., 2012), the observer blinded to group assignment quantified the four following spontaneous behavioural items: ‘Stand full, head down’ (dog was standing with full weight bearing of the operated stifle, while it had its head down), ‘Stand full, look around’ (dog was standing with full weight bearing of the operated stifle, while it was looking around), ‘Walk full’ (dog was walking with full weight bearing of the operated stifle), and ‘Trot full’ (dog was trotting with full weight bearing of the operated stifle). The videos were watched in a randomized order. For each video, the items were quantified by means of a computer-compatible time

coding (The Observer[®] XT, Noldus Information Technology, Tracksys Ltd., Nottingham, United Kingdom). The occurrence rate of each item recorded during the 2 hour period was used for further analysis.

3.3.5.5 Physiological data outcomes (EDA, motor activity)

3.3.5.5.1 EDA

Changes in skin conductance response (EDA) resulting from sympathetic neuronal activity (Storm, 2008) has recently been validated in the canine CCLT model of OA as a measurement of stress or pain that is strongly associated with functional outcomes (Moreau et al., 2011). The Pain Gauge[®] (PHIS, Inc., Dublin, OH, USA) device was applied to the right palmar paw (dry and non-clipped) of the dogs until the reading was recorded. Measurements ranged between 0.1 (the lowest pain and stress) and 9.9 (the highest pain and stress). Three readings were collected and averaged for thorough analysis.

3.3.5.5.2 Motor activity

Dog motor activity was recorded via an electronic chip placed on a neck collar (Actical[®]; Bio-Lynx Scientific Equipment, Inc., Montreal, QC, Canada). Monitoring was performed during 24 hours with an epoch length of 2 min. The intensity of motor activity (no unit) was recorded for each count. The 24-hour period was divided into the 2 following periods: a daylight period from 06:00 AM to 05:58 PM and a night period for the remaining time. Exploratory analysis of the data showed that the intensities of motor activity during the night period were of zero value for every dog. Therefore, only motor activity recorded during the daytime period was used. We used the median value of the intensities of motor activity recorded during the

daylight period. Motor activity recording was reliable and has been validated for monitoring pain-related functional disability in canine OA (Brown et al., 2010; Rialland et al., 2013).

3.3.5.6 Statistical analysis

3.3.5.6.1 Treatment effect in centralised pain (spinal pain neuropeptides and electrical QST sensitisation)

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

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

3.3.5.6.2 Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes

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

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

Pain scales – We first verified the reliability of the pain scales. Inter-observer reliability was tested in calculating intraclass coefficient [ICC (A,1)] between the VAS-1 and VAS-2 by use of a 2-way fixed-effects model for the repeated measures ANOVA. Spearman rank correlation tests (ρ) provided intra-observer reliability for the technician and veterinarian observers: respectively, VAS-1 score was correlated with the STAPS item #1 score, and VAS-2 score was correlated with the SVAPS item #1 score at both D28 and D56 such as the intra-observer reliability was performed only when dogs felt pain. The non parametric correlation was chosen because it fit the best to the distribution of the data and it was calculated using a paired data set where each "pair" was two different measurements made for a single unit. Cronbrach's α was calculated to estimate the internal consistency of both STAPS and SVAPS. In this study, data reliability was considered acceptable when ICC was higher than 0.80, ρ higher than 0.70, and Cronbrach's α higher than 0.70 (Streiner and Norman, 2003).

Repeated-measures generalized linear models with GEE were used for VAS, STAPS and SVAPS where data was assumed to distribute under the over-dispersed Poisson probability functions. The variance scale factor was

estimated by Pearson's chi-square/degree of freedom. Best working matrix was determined to be first-order autoregressive following the strategy proposed by Littell et al. (Littell et al., 2000).

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

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

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

Finally, if an association between the behavioural or physiological outcomes was significant with a centralised pain factor variable, we then evaluated the treatment effect while integrating (or not) the centralised pain

factor variable in the statistical model. For these models, the least squares means (LSM) and differences of estimated least squares means (DLSM) \pm SE are presented.

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

3.3.6 Results

3.3.6.1 Spinal cord neuropeptides

At D56, the tiludronate-treated dogs had different spinal cord concentrations of SP (Figure 1A) and TTR (Figure 1B) than those in the vehicle-treated dogs, both differences showing statistical significance ($p = 0.01$, and $p = 0.02$, respectively).

3.3.6.2 Electrical QST sensitisation

The analysis of QST-stifle revealed that for the vehicle-treated dogs, it decreased progressively from D-7 to D56, but the tiludronate-treated dogs only had decreased values at D28 (Figure 2A). These differences resulted in statistically significant effects for time ($p = 0.001$) and time \times treatment interaction ($p = 0.03$), but not for treatment ($p = 0.78$).

The analysis of QST-tail also revealed significant effects for time ($p < 0.0001$), and time \times treatment interaction ($p = 0.05$), but not for treatment (p

= 0.39). Figure 2B reveals a shallower decrease pattern for QST-tail in the vehicle-treated dogs compared to QST-stifle, but significance was reached at D56 compared to both D-7 (DLSM = -1.37 ± 0.13 , $p < 0.0001$) and D28 (DLSM = -0.87 ± 0.26 , $p = 0.0008$). In contrast, the QST-tail variation recorded in the tiludronate-treated dogs did not reach statistical significance.

3.3.6.3 Relationship between factors and both the behavioural and physiological evaluations

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

Relationship between the factor QST-stifle and both the behavioural and physiological evaluations – The multivariate GEE regression analysis indicated that both PVF (Slope [95% CI] = $0.019 [0.007, 0.030]$, $p = 0.001$) and 'Walk full' ($0.15 [0.01, 0.28]$, $p = 0.03$) increased with QST-stifle. Motor activity decreased with increasing QST-stifle ($0.62 [-1.24, -0.01]$, $p = 0.05$). From these three outcomes, only the GEE regression analysis of 'Walk full' yielded a significant time x treatment interaction ($p = 0.01$), not PVF or motor activity. There was no significant relationship between VAS-1, VAS-2, SVAPS, EDA, 'Stand full, head down', 'Stand full, look around' or 'Trot full' and QST-stifle.

Relationship between the factor QST-tail and both the behavioural and physiological evaluations – The multivariate GEE regression analysis indicated that PVF increased with QST-tail ($0.011 [0.001, 0.022]$, $p = 0.03$).

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

Relationship between the spinal cord biomarkers and both the behavioural and physiological evaluations – Only SP was positively associated with EDA (0.014 [0.01 - 0.028], $p = 0.05$), and VAS-2 (0.01 [0.001 - 0.020], $p = 0.05$). No other significant relationship was observed.

3.3.6.4 Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect

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

The results of the mixed model with QST-stifle as factor showed that only ‘Walk full’ differed between groups. At D56, its DLMS estimates were higher in the tiludronate-treated dogs than in the vehicle-treated dogs (DLMS = 0.79 ± 0.39 , $p_{\text{adj}} = 0.04$) (Figure 3A).

The results of the mixed model with QST-tail as factor showed that PVF, EDA, and ‘Walk full’ differed between groups. There was no

significant difference between treatment conditions for VAS-1, VAS-2, SVAPS and motor activity ($p_{\text{adj}} > 0.06$) (data not shown). However, when QST-tail was introduced in the model, the DLSP estimates of PVF were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs (Figure 3B), both at D28 (0.06 ± 0.02 , $p_{\text{adj}} = 0.04$) and D56 (0.06 ± 0.02 , $p_{\text{adj}} = 0.04$). For EDA at D28 (Figure 3C), the DLSP estimates were lower for tiludronate- than for vehicle-treated dogs (-2.98 ± 0.70 , $p_{\text{adj}} < 0.001$). At D56 (Figure 3D), the DLSP estimates of ‘Walk full’ were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs (1.01 ± 0.44 , $p_{\text{adj}} = 0.02$).

3.3.7 Discussion

The goal of this project was to assess centralised pain and the relationships between pain sensitisation and evaluation of OA symptoms in tiludronate- and vehicle-treated CCLT dogs. The novel findings of this study were that preventive and repeated administration of tiludronate reduced pronociceptive SP and concurrently increased TTR release at the spinal cord level when compared to placebo. There was no statistically significant difference between groups to support a treatment effect, but in contrast to vehicle-treated dogs, the tiludronate-treated dogs presented no peripheral (measured with QST-stifle) or central (measured with QST-tail) sensitisation 56 days post-CCLT when compared to D-7. First, these results support the development of peripheral and central sensitisation in the CCLT dog model at D28 and 56, after altered biomechanical stability and inflammation occurred. The pain sensitisation reported herein corroborates the reported findings in surgically induced OA in dogs (Brydges et al., 2012) and rats (Bove et al., 2006), as well as in naturally occurring OA in cats (Guillot et al., 2013). Secondly, although bisphosphonates have not been reported to provide central

analgesic activity, preventive tiludronate modulated onset of pain sensitisation and the release of spinal neuropeptides such as SP, and TTR. The bone remodelling and bone loss are active components of the OA disease process (Burr and Gallant, 2012), the anti-resorptive activity of tiludronate might have contributed to decreasing the severity of post traumatic OA process at early stage in this CCLT model (Moreau et al., 2011).

We demonstrated a strong relationship between behavioural and physiological data outcomes with the centralised pain factor outcomes, provided by measurement of spinal neuropeptides and peripheral and central QST sensitisation. In particular, methods including PVF, VAS, SVAPS, ‘Walk full’, EDA, and motor activity were related to pain sensitisation (QST-stifle or QST-tail). The third objective led to the demonstration that behavioural changes (‘Walk full’) and PVF at D56, and both PVF and EDA as early as D28, were related to central sensitisation (QST-tail) and differentiated tiludronate- from vehicle-treated dogs. This suggests that this research, encompassing statistical modalities, permitted the identification of validated surrogates for pain assessment in an OA dog model that are related to pain sensitisation. In addition, these statistical models will not necessarily produce different results compared with simpler methods. However, they tend to yield more accurate results, thereby increasing the likelihood that the findings might be replicable in future studies, or successfully translated to other species.

3.3.7.1 Sensitisation

As previously described in arthritic rats (Ivanavicius et al., 2007; Ferland et al., 2011), the concentration of spinal SP, a pain biomarker, increased at 56 days post CCLT. Increased spinal SP partly supports more

central sensitisation caused by the CCLT surgery in vehicle-treated dogs than in tiludronate-treated dogs. Higher SP was concomitant with a lower concentration of TTR at the spinal level in the vehicle-treated dogs when compared to tiludronate-treated dogs. Interestingly, concentration of TTR decreased in human patients suffering from rheumatoid arthritis (Li et al., 2010), whereas cerebrospinal fluid (CSF) TTR down-regulation (compared to baseline values) demonstrated an ability to predict the responsiveness to analgesics in a visceral experimental pain model in cows (Rialland et al., 2014). In the cow pain model, large volume CSF sampling allowed for a high-throughput screening of pain proteome. For all pain outcome measures tested in this experiment, the CSF TTR demonstrated the highest specificity and sensitivity (Rialland et al., 2014). It is thus conceivable that the inflammatory OA pain, similar to the condition met in rheumatoid arthritis, decreased the spinal concentration of TTR, a decrease, which was modulated by the anti-inflammatory activity of tiludronate.

Tiludronate-treated dogs presented some peripheral sensitisation at D28. Subsequently, the QST threshold was identical at D56 and D-7 in the skin area adjacent to the joint injury. A previous report described less inflammation, less degradation of articular tissue, and fewer changes in chemical biomarkers and histomorphometry following tiludronate treatment (Moreau et al., 2011). A partial but sustained anti-hyperalgesic effect of tiludronate was also demonstrated in the model of complete Freund Adjuvant monoarthritis in rats (Bertaim et al., 2013). Interestingly, meloxicam tested in this model was not very efficient against peripheral sensitisation (Bertaim et al., 2013), a result similar to this observed in OA cats (Guillot et al., 2013). All together, these results support that tiludronate decreased peripheral

sensitisation at the primary afferents directly involved in this experimental inflammatory joint model.

Vehicle-treated dogs presented a significant central sensitisation with measurement of QST-tail at D56 post CCLT. Tiludronate had significant effect at D56 on the release of spinal neuropeptides (lower SP, and higher TTR) compared to the vehicle group. This was also associated with a lack of significant central sensitisation, when compared to QST-tail measured at D-7, in the tiludronate group.

It is possible that a peripheral neuronal firing at 28 days post CCLT in tiludronate-treated dogs might be responsible for the peripheral sensitisation observed at this time-point. This neuronal firing was not subsequently transduced in a central sensitisation. This is supported by the electrophysiological studies demonstrating that the neuronal excitability in OA rodent models was caused by both activation of knee joint afferent fibres and increased dorsal horn neuronal activity (Rahman et al., 2009; Schuelert and McDougall, 2009; Im et al., 2010; Sagar et al., 2010). In addition, zoledronate, another bisphosphonate, reduced histological joint degradation in an MIA rodent model (Strassle et al., 2010; Yu et al., 2012) and its inhibition of subchondral bone lesions alleviated both joint pain and central nociceptive activation (Laslett et al., 2012; Yu et al., 2012). Tiludronate administration at early stage of the experimental OA process would support a delayed effect of bisphosphonate on occurring central pain at 56 days post CCLT, when compared to placebo.

Even if mechanical pressure QST seems a more physiologically relevant noxious stimulus method in inflammatory joint models and responsive to anti-inflammatory drug (Suokas et al., 2012), we opted for a broader electrical QST as the degree of central sensitisation was poorly

described in this experimental OA model and with the hypothesis that electrical QST would be more adapted to demonstrate a potential treatment effect of tiludronate to this outcome. The occurrence of both peripheral and central sensitisation at D56 demonstrated by electrical QST in the vehicle group, but not in the tiludronate group confirmed this hypothesis.

3.3.7.2 Relationship between centralised pain data outcomes and both the behavioural and physiological data outcomes

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

In the present study, the methods PVF, ‘Walk full’, and motor activity were associated with both peripheral and central sensitisation. These results corroborated the unwillingness to move the surgically-induced OA limb (Brandt et al., 1991a; Moreau et al., 2011) and the increased sensitisation after CCLT surgery (Brydges et al., 2012) in dogs. Nevertheless, the interpretation of these relationships was not straightforward. First, PVF was positively associated with QST-stifle and QST-tail. This demonstrated that an increased centralised pain sensation (translated into low QST thresholds) was

leading to a diminished weight bearing of the operated limb, and the contrary was true. This positive association was consistent with the decreased weight bearing and the increased sensitisation observed after surgically-induced OA in rodents (Fernihough et al., 2004; Pomonis et al., 2005; Bove et al., 2006). Likely, 'Walk full' was positively associated with QST-stifle, suggesting that 'Walk full' was associated with the peripheral pain related to the surgically-induced OA. Unexpectedly, 'Walk full' was positively associated with the central sensitisation. Similarly, the motor activity recorded by accelerometry was positively associated with both peripheral and central sensitisation. In naturally-occurring OA in dogs (Brown et al., 2010; Rialland et al., 2013) and cats (Guillot et al., 2013), continuous monitoring of daily motor activity revealed the usefulness of increased intensity (Guillot et al., 2013; Rialland et al., 2013) or daily duration (Moreau et al., 2011; Moreau et al., 2013) to detect a treatment effect. Difference in data acquisition might explain the observed difference between PVF and both 'Walk full' and motor activity in the present study. Recording of PVF is dictated by a standardised velocity during locomotion. Thus, PVF might translate joint ability and musculoskeletal adaptation to a limb injury during a forced walk cycle (Trumble et al., 2005; Boettger et al., 2009; Moreau et al., 2011). In contrast, 'Walk full' and motor activity were spontaneous behaviours, recorded in dogs with freedom of movement, and may describe how the dogs with OA desired to walk and manifest restlessness. Finally, video-capture in this study was only recorded during a 2 h-limited period of free exercise of the dogs, in contrast to a continuous monitoring. Together, these results offer the opportunity for a new interpretation of the methods used for pain assessment.

Finally, EDA was reliable on central sensitisation only, and spinal SP in our study. A positive correlation between an increased skin conductance

response following acute noxious stimulation and central pain activation was observed in human patients (Dubé et al., 2009), particularly at the limbic system of the brain (Dubé et al., 2009; Rouwette et al., 2012) that is implicated in the stress response to pain. Therefore, these results argue that EDA measurement is linked to central pain.

3.3.7.3 Sensitivity of the behavioural and physiological evaluations to detect a treatment effect

Using QST-stifle and QST-tail as factors highlighted a clear association between different behavioural and physiological methods and sensitisation over time, whereas the responsiveness to treatment allowed the selection of PVF, EDA and ‘Walk full’ to be related to central pain and differentiate both treatment groups. In a context of concurrent methods validation, these results support the use of PVF (Moreau et al., 2013) and ‘Walk full’ behaviour (Edamura et al., 2012) in assessing OA canine pain symptoms. For EDA, more investigation should be performed as EDA was not responsive to analgesia in animal pain models (Richardson et al., 2007; Baldrige et al., 2011), or partially responsive (Rialland et al., 2014). The association between QST and some other behavioural (PVF, ‘Walk full’) and physiological (EDA) outcome measures is supporting the use of these pain outcome measures, but would require confirmation.

Keeping in mind that the CCLT canine model is a dynamic model (Pond and Nuki, 1973), levels of inflammation and articular lesions were different from D28 to D56. In this study, only the results of the group comparison allow to hypothesize an effect of treatment on joint inflammation without taking account about the dynamic process of OA in this model. Again, more investigation should evaluate if tiludronate can be a confounding

factor for pain evaluation as tiludronate is an anti-resorptive compound and might modulate the joint degeneration when compared to a placebo in dog from 28 to 56 days post-CCLT.

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

3.3.8 Acknowledgements

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

3.3.9 Role of the funding sources

Dr Pascale Rialland received a doctoral Industrial Innovation Scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC #406726), the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT #144812) and ArthroLab, Inc. Mr. Maxim Moreau is the recipient of a Doctoral Scholarship from the Canadian Institutes of Health Research – MENTOR Strategic Training Initiative in Health Research

Program. This study was supported in part by a grant from CEVA Santé Animale, Libourne, France (Thierry Bertaim), by a grant of the Osteoarthritis Chair of the University of Montreal Hospital Centre, Université de Montréal, QC, Canada; an ongoing New Opportunities Fund (#9483) and a Leader Opportunity Fund (#24601) grants from the Canada Foundation for Innovation (Eric Troncy) for the pain/function equipment; Discovery grants (#327158-2008 and #441651-2013) from the NSERC (Eric Troncy) as operating fund for pain analyses. The funding sources, except CEVA Santé Animale, were not involved in the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, nor in the decision to submit the manuscript for publication.

3.3.10 Conflict of interest statement

All authors with the exception of Dr Thierry Bertaim have no competing interests. Dr Thierry Bertaim is a regular employee of CEVA, who provided experimental therapeutic agent, participated in the study design, data analysis and manuscript editing.

3.3.11 Appendices

Appendix 1 – Standardized Veterinarian Arthritis Pain Scale (SVAPS)

| | |
|---|---|
| Offers strong resistance to elevation of contralateral limb, and replaces it after 10 sec | 3 |
| Refuses to raise contralateral limb | 4 |

* The contralateral limb must be elevated at the level of the vertebra column for 1 min

Reaction to the palpation/ manipulation of the affected area*

| | Palpation * | Mobilisation *** | Clic |
|--|-----------------------|----------------------------|-------------|
| No visible or audible reaction | | | |
| After 4 manipulations | 0 | 0 | |
| Visible or audible reaction(s) | | | YES |
| At the 4th manipulation | 1 | 1 | |
| At the 3rd manipulation | 2 | 2 | NO |
| At the 2nd manipulation | 3 | 3 | |
| At the 1st manipulation or non evaluable** | 4 | 4 | |

* The operator begins with palpating the left hind limb from the thigh to the tarsum and finishing

with a tense palpation of the knee; afterthat, he is doing the same to the right limb with 4 (if possible) palpations of the knee

** Dog will not allow the examiner to palpate joint

***The operator manipulates the right joint by closing it in flexion (of 30 to 60° going from 135° to around 90°) for 3 seconds

before putting it back to normal and repeating the flexion for 4 (if possible) flexions of the knee. He is finishing with a small extension (up to 155°) of the knee.

Appendix 2 – Standardized Technician Arthritis Pain Scale (STAPS)

1/2

Standardized Technician Arthritis Pain Scale : a subjective pain evaluation made by the technician for dogs with osteoarthritis

Global assessment

Overall technician assessment for preceding month (or visit)

| Pain | Absent | | | | Intolerable |
|----------------------------|--------|----|-------------|---|-------------|
| Score | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <u>Response to therapy</u> | | | | | |
| Pain | Better | | No response | | Worse |
| Score | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 |

Static Attitude/ Behaviour

From the following list, check off any depressed/ diminished parameter

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Mood of dog during preceding month | <input type="checkbox"/> |
| Amount of daily activity* | <input type="checkbox"/> |
| Willingness to play voluntarily | <input type="checkbox"/> |
| Frequency of postures of a happy dog | <input type="checkbox"/> |
| Appetite | <input type="checkbox"/> |
| How often dog gets exercise | <input type="checkbox"/> |

From the following list, check off any change in attitude

| | |
|------------------------------------|--------------------------|
| Sleep (disturbance) | <input type="checkbox"/> |
| Social relationships (withdrawal) | <input type="checkbox"/> |
| Vocalization (audible complaining) | <input type="checkbox"/> |

| | | | | | |
|--------------------------------------|--------|---|--------|--------|--------|
| Total of notches (on a maximum of 9) | 0 to 1 | 2 | 3 to 4 | 5 to 7 | 8 to 9 |
| Score | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |

Dynamic Attitude

From the following list, check off any present parameter

- Stiffness/ difficulty when arising for the day (or after rest)
- Stiffness/ difficulty (moving after major activity) at end of the day (after activities)
- Lameness/ difficulty when mobility*
- Lameness/ difficulty when mobility**
- Pain when turning suddenly while walking
- Difficulty in sitting or laying down
- Difficulty in rising from a lying position
- Difficulty in squatting to urinate or defecate

* When regular activity: walking, trotting, galloping, running.

** When brutal activity: walking, jumping, climbing or descending stairs, ...

| | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|---|--------|--------|
| Total of notches (on a maximum of 8) | 0 | 1 | 2 | 3 to 4 | 5 to 8 |
|--------------------------------------|---|---|---|--------|--------|

| | | | | | |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Score | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|

TOTAL (-2 to 14) =

3.3.12 References

- Agresti A (2002). *Categorical data analysis*. New York, Wiley-Interscience.
- Baldridge SL, Coetzee JF, Dritz SS, Reinbold JB, Gehring R, Havel J, Kukanich B (2011). Pharmacokinetics and physiologic effects of intramuscularly administered xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride-butorphanol tartrate alone or in combination with orally administered sodium salicylate on biomarkers of pain in Holstein calves following castration and dehorning. *Am J Vet Res* 72(10): 1305-1317.
- Bertaim T, Chapuy E, Caussade F, Ardid D (2013). Dose and administration schedule effect of tiludronate on joint damage in the model of complete Freund adjuvant induced monoarthritis in rats. *Open J Rheum Autoimmune Dis* 3: 18-25.
- Boettger MK, Weber K, Schmidt M, Gajda M, Bräuer R, Schaible H-G (2009). Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis. *Pain* 145(1-2): 142-150.
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Paré F, Troncy E, Moreau M, Pelletier J-P (2010). Oral treatment with a *Brachystemma calycinum* D don plant extract reduces disease symptoms and the development of cartilage lesions in experimental dog osteoarthritis: Inhibition of protease-activated receptor 2. *Ann Rheum Dis* 69(6): 1179-1184.
- Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, Osborn MN, Sanchez BM, Guzman RE, Hook KE, Juneau PL, Connor JR, Kilgore KS (2006). Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage* 14(10): 1041-1048.
- Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M (1991a). Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: A bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol.* 18(3): 436-446.

- Brandt KD, Myers SL, Burr D, Albrecht M (1991b). Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *arthritis Rheum* 34(12): 1560-1570.
- Brown DC, Boston RC, Farrar JT (2010). Use of an activity monitor to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 237(1): 66-70.
- Brydges NM, Argyle DJ, Mosley JR, Duncan JC, Fleetwood-Walker S, Clements DN (2012). Clinical assessments of increased sensory sensitivity in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Vet J* 193(2): 545-550.
- Burr D, Gallant M (2012). Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8(11): 665-673.
- Che FY, Fricker LD (2002). Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Anal Chem* 74(13): 3190-3198.
- Dolgin E (2010). Animalgesic effects. *Nat Med* 16(11): 1237-1240.
- Dubé A-A, Duquette M, Roy M, Lepore F, Duncan G, Rainville P (2009). Brain activity associated with the electrodermal reactivity to acute heat pain. *Neuroimage* 45(1): 169-180.
- Edamura K, King JN, Seewald W, Sakakibara N, Okumura M (2012). Comparison of oral robenacoxib and carprofen for the treatment of osteoarthritis in dogs: A randomized clinical trial. *J Vet Med Sci* 74(9): 1121-1131.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F (2011). Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45(6): 423-429.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J (2004). Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112(1-2): 83-93.

- Gronblad M, Liesi P, Korkala O, Karaharju E, Polak J (1984). Innervation of human bone periosteum by peptidergic nerves. *Anat Rec* 209(3): 297-299.
- Guillot M, Moreau M, Heit M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Troncy E (2013). Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet J* 196(3): 360-367.
- Hielm-Björkman AK, Kapatkin AS, Rita HJ (2011). Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dogs. *Am J Vet Res* 72(5): 601-607.
- Im H-J, Kim J, Li X, Kotwal N, Sumner DR, Wijnen AJv, Davis FJ, Yan D, Levine B, Henry JL, Desevré J, Kroin JS (2010). Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* 62(10): 2995-3005.
- Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, Westwood FR, Murray F, Read SJ (2007). Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: Increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 128(3): 272-282.
- Lascelles BDX (2013). Getting a sense of sensations. *Vet J* 197(2): 115-117.
- Laslett L, Doré D, Quinn S, Boon P, Ryan E, Winzenberg T, Jones G (2012). Zoledronic acid reduces knee pain and bone marrow lesions over 1 year: a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 71(8): 1322-1328.
- Li TW, Zheng BR, Huang ZX, Lin Q, Zhao LK, Liao ZT, Zhao JJ, Lin ZM, Gu JR (2010). Screening disease-associated proteins from sera of patients with rheumatoid arthritis: a comparative proteomic study. *Chin Med J* 123(5): 537-543.
- Littell RC, Pendergast J, Natarajan R (2000). Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat Med* 19(13): 1793-1819.
- Little CB, Hunter DJ (2013). Post-traumatic osteoarthritis: From mouse models to clinical trials. *Nat Rev Rheumatol* 9(8): 485-497.

- Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W (2005). Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 7(1): R156-R165.
- Martinez SA (1997). Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27(4): 735-758.
- Martinez SA, Coronado GS (1997). Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27(4): 759-775.
- Mogil JS (2009). Animal models of pain: Progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10(4): 283-294.
- Moore SA, Hettlich BF, Waln A (2013). The use of an electronic von Frey device for evaluation of sensory threshold in neurologically normal dogs and those with acute spinal cord injury. *Vet J* 197(2): 216-219.
- Moreau M, Pelletier J-P, Lussier B, d'Anjou M-A, Blond L, Pelletier J-M, del Castillo JRE, Troncy E (2013). A posteriori comparison of natural and surgical destabilization models of canine osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013: Article ID 180453.
- Moreau M, Rialland P, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, Caron J, Frank D, Lussier B, del Castillo JRE, Beauchamp G, Gauvin D, Bertaim T, Thibaud D, Troncy E (2011). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 13(3): R98.
- Pailleux F, Vachon P, Lemoine J, Beaudry F (2013). Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides* 47(4): 261-271.
- Pelletier J-P, Kapoor M, Fahmi H, Lajeunesse D, Blesius A, Maillet J, Martel Pelletier J (2013). Strontium ranelate reduces the progression of

experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1 β in the synovium. *Ann Rheum Dis* 72(2): 250-257.

- Pelletier J-P, Troncy É, Bertaim T, Thibaud D, Goulet A-C, Abram F, Caron J, Boileau C, d'Anjou M-A, Moreau M, Lussier B, Martel-Pelletier J (2011). Treatment with tiludronic acid helps reduce the development of experimental osteoarthritis lesions in dogs with anterior cruciate ligament transection followed by reconstructive surgery: a 1-year study with quantitative magnetic resonance imaging. *J Rheumatol* 38(1): 118-128.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K (2005). Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114(3): 339-346.
- Pond M, Nuki G (1973). Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-388.
- Proffen BL, McElfresh M, Fleming BC, Murray MM (2012). A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *Knee* 19(4): 493-499.
- Quessy SN (2010). The challenges of translational research for analgesics: the state of knowledge needs upgrading and some uncomfortable deficiencies remain to be urgently addressed. *J Pain* 11(7): 698-700.
- Quinn MM, Keuler NS, Lu Y, Faria ML, Muir P, Markel MD (2007). Evaluation of agreement between numerical rating scales, visual analogue scoring scales, and force plate gait analysis in dogs. *Vet Surg* 36(4): 360-367.
- Rahman W, Bauer C, Bannister K, Vonsy J-L, Dolphin A, Dickenson A (2009). Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 5(1): 45.
- Reginster J-Y, Badurski J, Bellamy N, Bensen W, Chapurlat R, Chevalier X, Christiansen C, Genant H, Navarro F, Nasonov E, Sambrook P, Spector

- T, Cooper C (2013). Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 72(2): 179-186.
- Rialland P, Authier S, Guillot M, Del Castillo JR, Veilleux-Lemieux D, Frank D, Gauvin D, Troncy E (2012). Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: A prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. *PLoS One* 7(11): e49480.
- Rialland P, Bichot S, Lussier B, Moreau M, Beaudry F, del Castillo JRE, Gauvin D, Troncy E (2013). Effect of a diet enriched with green-lipped mussel on pain behavior and functioning in dogs with clinical osteoarthritis. *Can J Vet Res* 77(1): 66-74.
- Rialland P, Otis C, de Courval M-L, Mulon P-Y, Harvey D, Bichot S, Gauvin D, Livingston A, Beaudry F, Frank D, del Castillo JRE (2014). Assessing experimental visceral pain in the dairy cattle: a pilot, prospective, blinded, randomised and controlled study focusing on spinal pain proteomics. *J Dairy Sci* 97(4): 2118-2134.
- Richardson CA, Niel L, Leach MC, Flecknell PA (2007). Evaluation of the efficacy of a novel electronic pain assessment device, the Pain Gauge, for measuring postoperative pain in rats. *Lab Anim* 41(1): 46-54.
- Rouwette T, Vanelderen P, de Reus M, Loohuis NO, Giele J, van Egmond J, Scheenen W, Scheffer GJ, Roubos E, Vissers K, Kozicz T (2012). Experimental neuropathy increases limbic forebrain CRF. *Eur J Pain* 16(1): 61-71.
- Sagar DR, Staniaszek LE, Okine BN, Woodhams S, Norris LM, Pearson RG, Garle MJ, Alexander SP, Bennett AJ, Barrett DA, Kendall DA, Scammell BE, Chapman V (2010). Tonic modulation of spinal hyperexcitability by the endocannabinoid receptor system in a model of osteoarthritic pain. *Arthritis Rheum* 62(12): 3666-3676.

- Schuelert N, McDougall JJ (2009). Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett* 465(2): 184-188.
- Storm H (2008). Changes in skin conductance as a tool to monitor nociceptive stimulation and pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 21(6): 796-804.
- Strassle BW, Mark L, Leventhal L, Piesla MJ, Jian Li X, Kennedy JD, Glasson SS, Whiteside GT (2010). Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthritis Cartilage* 18(10): 1319-1328.
- Streiner DL, Norman GR (2003). *Health measurement scales: A practical guide to their development and use*. New York, Oxford University Press.
- Suokas AK, Walsh DA, McWilliams DF, Condon L, Moreton B, Wylde V, Arendt-Nielsen L, Zhang W (2012). Quantitative sensory testing in painful osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 20(10): 1075-1085.
- Torres L, Dunlop DD, Peterfy C, Guermazi A, Prasad P, Hayes KW, Song J, Cahue S, Chang A, Marshall M, Sharma L (2006). The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14(10): 1033-1040.
- Trumble TN, Billingham RC, Bendele AM, McIlwraith CW (2005). Evaluation of changes in vertical ground reaction forces as indicators of meniscal damage after transection of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am J Vet Res* 66(1): 156-163.
- Waxman AS, Robinson DA, Evans RB, Hulse DA, Innes JF, Conzemius MG (2008). Relationship between objective and subjective assessment of limb function in normal dogs with an experimentally induced lameness. *Vet Surg* 37(3): 241-246.
- Yu DG, Yu B, Mao YQ, Zhao X, Wang XQ, Ding HF, Cao L, Liu GW, Nie SB, Liu S, Zhu ZA (2012). Efficacy of zoledronic acid in treatment of

teoarthritis is dependent on the disease progression stage in rat medial meniscal tear model. *Acta Pharmacol Sin* 33(7): 924-934.

Yusuf E, Kortekaas M, Watt I, Huizinga TWJ, Kloppenburg M (2011). Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis* 70(1): 60-67.

Zhang Y, Nevitt M, Niu J, Lewis C, Torner J, Guermazi A, Roemer F, McCulloch C, Felson DT (2011). Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 63(3):691-699.

3.3.13 Table

Table I- Treatment effect without including the predictors

| Measures ^a | | Treatment | Time | Time × treatment | Group difference Differences of Time × treatment Least Squares Means ± SEM ^b |
|------------------------------------|---------------|-----------|------------------|------------------|--|
| PVF | F | 3.56 | 686.35 | 4.72 | Tiludronate > placebo at D56 0.59 ± 0.24 |
| | p | 0.08 | <.0001 | 0.01 | p _{adj} = 0.03 |
| VAS 1 | F | 1.30 | 2.85 | 1.77 | |
| | p | 0.26 | 0.09 | 0.18 | |
| VAS 2 | F | 3.69 | 13.56 | 0.60 | |
| | p | 0.05 | 0.0002 | 0.44 | |
| SVAPS | F | 3.77 | 0.01 | 0.14 | |
| | p | 0.05 | 0.99 | 0.70 | |
| Stand full, head down | Chi-Sq | 0.95 | 35.15 | 3.68 | Tiludronate > placebo at D56 1.07 ± 0.49 |
| | p | 0.33 | <.0001 | 0.05 | p _{adj} = 0.03 |
| Stand full, look around | Chi-Sq | 0.31 | 18.04 | 0.68 | |
| | p | 0.58 | <.0001 | 0.41 | |
| Walk full | Chi-Sq | 3.47 | 81.46 | 7.88 | Tiludronate > placebo at D56 1.65 ± 0.53 |
| | p | 0.06 | <.0001 | 0.005 | p _{adj} = 0.002 |
| Trot full | Chi-Sq | 3.08 | 96.37 | 7.43 | Tiludronate > placebo at D56 1.84 ± 0.58 |
| | p | 0.08 | <.0001 | 0.006 | p _{adj} = 0.002 |
| EDA | F | 0.99 | 2.16 | 3.03 | |
| | p | 0.38 | 0.15 | 0.06 | |
| Motor activity * | F | 0.26 | 14.74 | 2.36 | |
| | p | 0.60 | 0.066 | 0.30 | |

^a Measures were the following: Peak vertical force (PVF); Visual analog scale of Observer 1 (VAS-1); Visual analog scale of Observer 2 (VAS-2); Standardized Veterinarian Arthritis Pain Scale (SVAPS); Electrodermal activity (EDA); the four

spontaneous behaviours: ‘Walk full’ (dog was walking with full weight bearing of the operated limb), ‘Stand full, head down’ (dog was standing with full weight bearing of the operated limb while dog had its head down), ‘Stand full, look around’ (dog was standing with full weight bearing of the operated limb while dog was looking around), and ‘Trot full’ (dog was trotting with full weight bearing of the operated limb); and Motor activity. Data present the results of the tests (F or the Chi-square (Chi-sq) tests), and the p-value (p) of the type 3 fixed effects for time, treatment condition and the interaction between time and treatment condition (time × treatment). Boldface highlights the significant type 3 fixed effects. * Values recorded at D-7 were used as covariates in the model. Significant group differences are presented by the differences in time × treatment least squares means, ^b Standard error of means (SEM), and the adjusted p-value (p_{adj}) of the *post-hoc* analysis.

3.3.14 Figure legends

Figure 1 - Effects of vehicle and tiludronic acid (2 mg/kg SC, q2week, starting at D0) on the concentration of (A) substance P and (B) transthyretin in the spinal cord. The results are presented in box plots with medians and interquartile ranges. A star indicates significantly different values between treatment conditions with two-sided Welch’s *t*-test at D56, $p < 0.05$.

Figure 2 - Effects of vehicle and tiludronic acid (2 mg/kg SC, q2week, starting at D0) on the electrical quantitative sensory testing (QST) when stimulus was applied on A) the stifle (QST-stifle)¹; and B) the tail (QST-tail)². The results are expressed as the mean + standard error of mean (SEM). # indicates significantly different QST values over time for the same treatment condition, $p_{adj} < 0.05$.

¹ Wald statistics for type 3 GEE analysis for time (Chi-square = 13.1, $p = 0.001$), time \times treatment interaction (Chi-square = 6.4, $p = 0.03$), and treatment (Chi-square = 0.1, $p = 0.78$).

² Wald statistics for type 3 GEE analysis for time (Chi-square = 1.89, $p < 0.0001$), time \times treatment interaction (Chi-square = 5.9, $p = 0.05$), and treatment (Chi-square = 1.8, $p = 0.19$).

Figure 3 - Histogram of the least squares means (LSM) estimates + standard error of mean (SEM) derived from generalized linear analyses of: A) ‘Walk full’ when quantitative sensory testing applied on the stifle (QST-stifle) was factor¹; B) Peak vertical force (PVF) when QST applied on the tail (QST-tail) was factor²; C) Electrodermal activity when QST-tail was factor³; D) ‘Walk full’ when QST-tail was factor⁴. Different letters indicate significantly different values between vehicle-treated dogs and tiludronate-treated dogs (tiludronic acid, 2 mg/kg SC, q2week, starting at D0), $p_{\text{adj}} < 0.05$.

¹ Type 3 tests of fixed effects for time (F Value = 93.3, $p < 0.0001$), time \times treatment interaction (F Value = 6.0, $p = 0.01$), and treatment (F Value = 2.8, $p = 0.09$). At D56, DLSM estimates were higher in the tiludronate-treated dogs than in the vehicle-treated dogs (DLSM = 0.79 ± 0.39 , $p_{\text{adj}} = 0.04$)

² Type 3 tests of fixed effects for time (F Value = 515.3, $p < 0.0001$), time \times treatment interaction (F Value = 3.0, $p = 0.04$), and treatment (F Value = 3.1, $p = 0.05$). The DLSM estimates of PVF were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs, both at D28 (0.06 ± 0.02 , $p_{\text{adj}} = 0.04$) and D56 (0.06 ± 0.02 , $p_{\text{adj}} = 0.04$)

³ Type 3 tests of fixed effects for time (F Value = 5.1, $p = 0.07$), time \times treatment interaction (F Value = 19.9, $p < 0.0001$), and treatment (F Value = 6.7, $p = 0.009$). At D28, DLSP estimates were lower for tiludronate- than for vehicle-treated dogs (-2.98 ± 0.70 , $p_{\text{adj}} < 0.001$)

⁴ Type 3 tests of fixed effects for time (F Value = 88.3, $p < 0.0001$), time \times treatment interaction (F Value = 8.4, $p = 0.004$), and treatment (F Value = 3.3, $p = 0.04$). At D56, DLSP estimates of 'Walk full' were higher in tiludronate- than in vehicle-treated dogs (1.01 ± 0.44 , $p_{\text{adj}} = 0.02$).

3.3.15 Figures

Figure 1

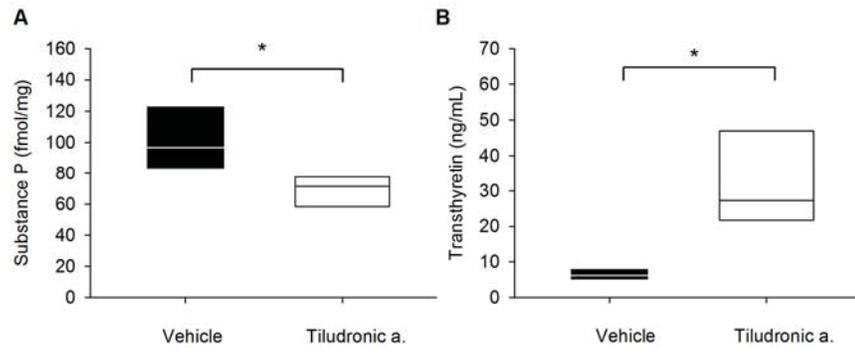


Figure 2

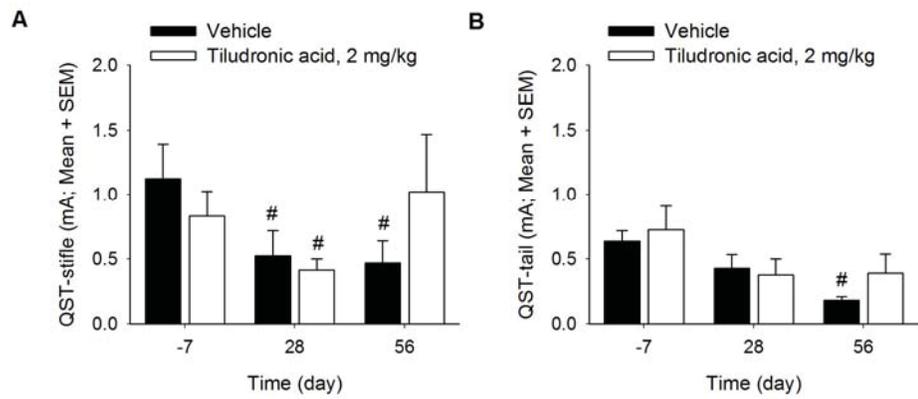
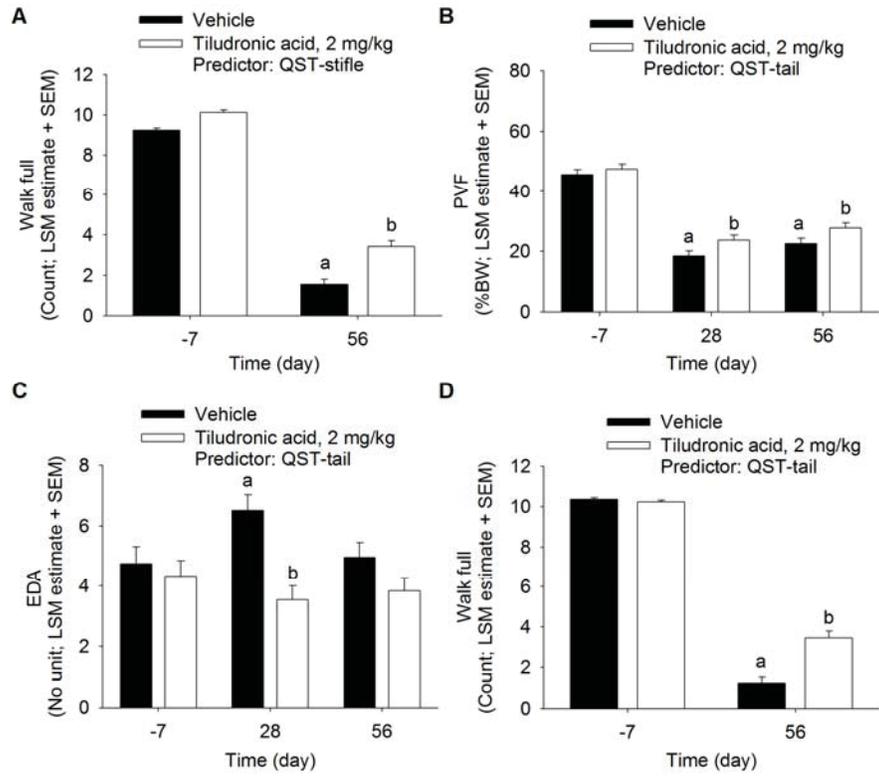


Figure 3



3.3.16 Additional information: Relationship between PVF and both the behavioral and physiological evaluations

3.3.16.1 Methods

We evaluated the significant relationship between PVF and the dependent variable (pain scores, video-analysis, EDA and motor activity). A threshold of $p = 0.05$ was used for including the factor in the model. Second, each dependent variable was examined as a function of the fixed effects of time, treatment, time per treatment interaction, and PVF. Third, we emphasized on the significant models that indicated significant association with the predictor variable and a significant main effect for the interaction of the treatment condition with time. For these models, the Least Square Means (LSM) estimates are presented as mean + SEM. The planned comparisons between treatment conditions at each time were adjusted with Bonferroni correction.

3.3.16.2 Results

The results of the GEE regression models yielded that VAS-1 ($p < 0.0001$), VAS-2 ($p < 0.0001$), SVAPS ($p = 0.003$) and ‘Stand full, look around’ ($p = 0.05$) were negatively associated with PVF (Table III). In addition, ‘Stand full, head down’ ($p = 0.002$) and ‘Walk full’ were positively associated with PVF. The GEE models yielded significant effect of the interaction between time and treatment condition for both VAS-2 ($p = 0.05$) and ‘Walk full’ ($p = 0.009$).

LSM estimates of ‘Walk full’ in the tiludronate-treated dogs was different than those in placebo-treated dog when PVF is introduced into the model at D56 ($p = 0.03$), suggesting that changes of both PVF and ‘Walk

full' are relied on pain perception. There was no significant difference between treatment conditions for VAS-2 ($p > 0.06$)

3.3.16.3 Discussion and conclusion

This additional data emphasises on the validity of both PVF and 'Walk full' in dogs with surgically induced osteoarthritis. Taking account that we have demonstrated a clear relationship between both PVF and 'Walk full' and pain sensitisation, we can suppose a three-way relationship between PVF, 'Walk full,' and pain sensitisation in dogs with osteoarthritis. Interestingly, 'Walk full' was a reliable and validated pain measurement in dogs following

'Stand full, head down' (dog was standing with full weight bearing of the operated while dogs had head down), 'Stand full, look around' (dog was standing with full weight bearing of the operated while dogs was looking around), and VAS-2 were not sensitive to treatment effect when PVF was a predictor and lack of sensitivity to treatment was also observed when QST-stifle and QST-tail were included as predictors. The following behaviors 'Stand full, head down', 'Stand full, look around', and VAS-2 were not predictive of pain in dogs at 24 h and 48 h following a knee surgery (project #2). This suggests that these measurements do not have clear relationship to pain or/and reliability and validity of these measurements are not satisfying enough to be part of a package for pain evaluation in dogs.

This three-way relationship between PVF, 'Walk full', and central sensitisation opens new opportunity for clinicians or researchers to evaluate pain in dogs. The choice of the final measurement might be evaluated against the utility and the feasibility of the measurement in either experimental or clinical settings.

3.3.17 Données additionnelles sur la méthodologie de codage de la vidéo-analyse

La recherche posait la question de l'expression de la douleur articulaire chronique. L'éthogramme développé pour l'étude #2 a été réutilisé dans l'étude #3. Le contenu des items, leur définition et la procédure standardisée de codage était identique de l'étude #2. Le codeur était un vétérinaire expérimenté en évaluation de la douleur (ET), naïf sur la distribution des groupes de traitement. La formation du codeur s'est opérée par un apprentissage en visionnant et en codant les comportements de plusieurs films avec la collaboration de la comportementaliste (DF) jusqu'à obtenir un accord raisonnable avec la comportementaliste et le codeur (seuil de décision : $CCI > 0,70$) sur 10% de vidéos randomisées.

La fiabilité intra-observateur a été calculée sur 10% des vidéos visualisées de façon randomisées en fin de programme d'analyse. Les coefficients de corrélations intraclasse étaient supérieurs à 0,70 pour l'ensemble des comportements spontanés à l'exception de '*immobile while looking around*' ($CCI = 0,68$), '*silent*' ($CCI = 0,23$) et '*ears twitching*' ($ICC = 0,45$). Ces résultats ne montraient pas d'erreur de mesure pour l'ensemble des comportements évalués pour l'étude.

3.4 Article 4

Rialland P^{1,2}, Bichot S¹, Moreau M^{1,2}, Guillot M^{1,2}, Lussier B^{2,3}, Gauvin D^{1,2}, Martel-Pelletier J², Pelletier JP², Troncy E^{1,2} (2012). **Clinical validity of outcome pain measures in naturally occurring canine osteoarthritis.** BMC Vet Res 8 (1): 162 (Facteur d'impact sur 3 ans de 2,077).

¹GREPAQ (Research Group in Animal Pharmacology of Quebec), Department of Biomedical Sciences; ³The Companion Animal Research Group; Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe (QC), J2S 7C6, Canada; ²Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Notre-Dame Hospital, Montréal (QC), H2L 4M1, Canada.

3.4.1 Contexte de la recherche

Les études de recherche chez le chien (études #2 et #3) évaluaient la douleur aigüe et chronique en utilisant de multiples mesures sur des modèles de douleur expérimentaux standardisés. Ces études ont successivement permis de trier et évaluer au même moment les mesures et le construit sous-jacent à la mesure de la douleur. Les différentes mesures ont montré un lien entre la douleur articulaire et l'atteinte articulaire. Ces résultats suggèrent que la boiterie est une mesure valide de la douleur articulaire. Dès lors certaines méthodes comme la mesure objective de la boiterie (PVF) et de la locomotion (comportement observés par vidéo-analyse) semblent spécifiques du modèle articulaire. À l'inverse, l'AED et l'activité bio-téléométrique semblent incertaines et la validité serait à vérifier en condition clinique de douleur chronique. Les échelles de douleur standardisées, en l'état actuel de leur développement, n'ont pas montré de propriétés psychométriques satisfaisantes. Selon les données de recension de littérature, une échelle nommée CSOM, de type proxy, semblait différencier des groupes de douleur et identifierait les comportements propres de l'animal affectés par la douleur (Gingerich and Strobel, 2003; Lascelles et al., 2008).

A cette étape de la validation, l'objectif de l'étude est d'évaluer la validité des mesures sur une étude témoin chez des chiens atteints d'arthrose naturelle et dont la douleur est modulée par une diète alimentaire enrichie en moules vertes. Cette étude permettrait de confronter les résultats obtenus en milieu expérimental standardisé aux résultats obtenus en conditions cliniques chez le chien ayant une douleur chronique causée par l'arthrose. Surtout, cette étude permettra de confirmer ou d'infirmer la validité de mesures comme l'EAD ou l'activité bio-téléométrique à différencier des groupes de douleur

alors que la mesure de référence demeure la mesure de PVF sur modèle articulaire.

3.4.2 Résumé

L'arthrose est une entité pathologique unique dont les causes et les symptômes sont variables. La variabilité des symptômes de l'arthrose pourrait expliquer la difficulté à standardiser la mesure de la douleur associée à l'arthrose. La validité conceptuelle de l'analyse cinétique de l'allure et des méthodes évaluant le niveau d'invalidité fonctionnelle ont guidé leur utilisation dans l'évaluation de la douleur arthrosique. Toutefois, aucun consensus n'existe sur les meilleures méthodes cliniques d'évaluation de la douleur dans l'arthrose canine, en particulier lorsqu'il s'agit de tester un traitement avec un effet taille anticipé moindre que celui des analgésiques classiques.

L'étude actuelle traite de la validité des méthodes à évaluer les changements des mesures au cours du temps chez des chiens diagnostiqués arthrosiques traités par une diète enrichie en moule verte. Les méthodes incluaient des méthodes comportementales objectives (PFV, activité motrice), subjectives (mesure de l'activité comme indicateur de bien être et de douleur avec une échelle nommée CSOM et l'échelle de douleur standardisée orthopédique nommée MFQ (*Multifactorial pain questionnaire*) et physiologiques (mesure de l'AED). Les chiens étaient alimentés avec une diète contrôle standardisée durant 30 jours puis une diète alimentaire enrichie en moule verte durant 60 jours. L'hypothèse reposait sur une diminution de la douleur suivant un traitement quotidien de diète enrichie en moule verte.

Avec un traitement dont l'effet attendu reste faible, le PFV est la mesure la plus sensible à l'effet de la diète enrichie en moule verte. Les scores de CSOM diminuaient et l'activité motrice augmentait suivant les 90 jours après les changements de diète. Les mesures qualitatives (CSOM) et quantitatives (activité motrice par accélérométrie) de l'activité présentaient de moins bonnes qualités métrologiques que PFV. Le CSOM était corrélé à la fois à PFV et à l'activité motrice. La mesure de l'AED et les échelles standardisées de douleur ne mettaient pas en évidence un effet traitement.

Synthèse – Les trois méthodes sont concordantes mais de sensibilités différentes à détecter l'effet de la diète enrichie en moule verte. La différence de sensibilité pourrait être expliquée par les erreurs de mesure des méthodes ou par la nature même de ce qui est mesuré : une mesure de la boiterie pour le PFV, une mesure du comportement et du confort pour le CSOM et une mesure de l'activité motrice avec l'accéléromètre. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que le PFV serait une mesure de capacité fonctionnelle de l'articulation alors que l'activité serait une mesure de l'adaptation du chien vis-à-vis de la présence de douleur. L'échelle de douleur standardisée MFQ n'était pas sensible au traitement, à l'inverse de l'échelle CSOM. Avantageusement, le CSOM décrivait individuellement le comportement du chien arthrosique, ce qui fait de cet instrument une source de référence et de compréhension de la douleur clinique associée à l'arthrose canine.

Cette étude supporte une fois de plus le manque de validité de nos échelles de douleur standardisées. Les résultats de PFV supportent la mesure objective de la boiterie mais CSOM et l'activité motrice sont des indicateurs de la qualité de vie des chiens. Le lien avec la douleur centrale serait à confirmer.

3.4.3 Abstract

Background. The conceptual validity of kinetic gait analysis and disability outcome assessment methods has guided their use in the assessment of pain caused by osteoarthritis (OA). No consensus on the best clinical methods for pain evaluation in canine OA exists, particularly, when evaluating treatments where a smaller treatment effect is anticipated than with pharmacological pain killers. This study thus aimed at determining the technical validity of some clinical endpoints on OA pain in dogs using the green-lipped mussel (GLM)-enriched diet.

Methods. Twenty-three adult dogs with clinical OA completed the prospective controlled study. All the dogs were fed a balanced diet over a 30-day control period followed by a GLM-enriched diet over a 60-day period. The kinetic gait analysis parameter (PVF_{BW} , peak vertical force adjusted for body weight change), electrodermal activity (EDA), and a standardized multifactorial pain questionnaire (MFQ) were performed on day (D) 0 (inclusion), D30 (start) and D90 (end). The owners completed a client-specific outcome measures (CSOM) instrument twice a week. Motor activity (MA) was continuously recorded in seven dogs using telemetered accelerometric counts. We hypothesized that these methods would produce convergent results related to diet changes. A Type I error of 0.05 was adjusted to correct for the multiplicity of the primary clinical endpoints.

Results. Neither the EDA nor the MFQ were found reliable or could be validated. Changes in the PVF_{BW} ($P_{adj} = 0.0004$), the CSOM ($P_{adj} = 0.006$) and the MA intensity ($P_{adj} = 0.02$) from D0 to D90 suggested an effect of diet(s). Only the PVF_{BW} clearly increased after the GLM-diet ($P_{adj} = 0.003$).

The CSOM exhibited a negative relationship with the PVF_{BW} (P = 0.02) and MA duration (P = 0.02).

Conclusions. The PVF_{BW} exhibited the best technical validity for the characterization of the beneficial effect of a GLM-enriched diet. The CSOM and MA appeared less responsive following a GLM-diet, but these measures appeared complementary to gait analysis. Apparently, the CSOM provides the capacity to rely on pain OA assessment influenced by both lameness quantification (PVF_{BW}) and physical functioning (MA).

Keywords: Psychometrics; Dog osteoarthritis, Pain, Metrology; Kinetics; Accelerometry; Behavioral scales; Skin conductance.

3.4.4 Background

The prevalence of osteoarthritis (OA) in the canine population (20% of adult and 80% of the geriatric (> 8 years old) dogs in North America (Johnston, 1997)) makes the disease a major cause of concern. The distortion between clinical and radiographic finding in dog OA is well recognized (Gordon et al., 2003). The symptomatic signs of OA are highly variable, related to pain and physical functioning, and translated into limb impairment, activities limitations and restricted participation (Dray and Read, 2007; Brandt et al., 2008; Goldring, 2008). This situation led to the use of multiple methods to assess the efficacy of OA treatment (Pollard et al., 2009). However, interpretations are not always clear, the results are often inconsistent and clinical validation of these methods is often missing.

The conceptual validity ^a of the canine pain scales designed for OA and chronic pain has evolved over time (Hielm-Bjorkman et al., 2003; Hudson et al., 2004; Wiseman-Orr et al., 2006; Brown et al., 2007; Brown et al., 2008). These scales have demonstrated their sensitivity to detect response to OA treatment where pain was reduced following nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) (Brown et al., 2008; Hielm-Bjorkman et al., 2009a; Hielm-Bjorkman et al., 2009c), nutraceutical (Hielm-Bjorkman et al., 2009b) or other nontraditional (Hielm-Bjorkman et al., 2009c; Moreau et al., 2011a) treatment for OA. However, divergent interpretations were addressed when comparing subjective pain scores to an objective evaluation of lameness (Hielm-Bjorkman et al., 2009b; Hielm-Bjorkman et al., 2009c), emphasizing the limited information on the relationship between pain scales and OA severity. The majority of standardized multifactorial pain questionnaires (MFQ) are guided by the traditional notion of an inevitably progressive and degenerative disease process; greater behavioral changes indicate higher OA

severity and pain in dogs. However, OA is a heterogeneous group of painful conditions (Smith et al., 2001; Clements et al., 2006). The variety of OA signs suggests the need for the implementation of a clinical assessment that includes a broader variable profile than the current standardized OA profile. For this purpose, the client-specific outcome measures (CSOM) require the owner to report pain behavioral changes and/or impaired activities in their OA-afflicted dogs (Gingerich and Strobel, 2003; Lascelles et al., 2008). However, the promising CSOM have not met the technical validity ^b criteria (Lascelles et al., 2008). These data suggest that psychometric ^c support for the CSOM instrument is required.

The enhancement of a measurement's interpretability requires the referencing of its value to another measurement with established conceptual validity and interpretability. A surrogate to pain evaluation, vertical ground reaction forces, such as PVF and vertical impulse, measured through objective kinetic analysis have prevailed over pain measurements to quantify limb impairment (Rumph et al., 1995; Budsberg, 2001). Interestingly, the PVF variable showed sensitivity ^d and responsiveness ^e for the efficacy of the anti-inflammatory, analgesic and structural effects of NSAID (Vasseur et al., 1995; Budsberg et al., 1999; Moreau et al., 2003; Moreau et al., 2007) and nontraditional (Hielm-Bjorkman et al., 2009c) treatments, which supports a regulatory claim for these treatments for osteoarthritic dogs.

Physical activity represents a distinct dimension of physical functioning (Wilson and Palermo, 2012), and as such, telemetered motor activity (MA) is an objective behavioral method for the clinical assessment of physical function and overall well-being for canine OA (Hansen et al., 2007; Brown et al., 2010). However, more data are required to confirm its validity for pain evaluation in OA clinical trials.

Clinicians must be able to interpret the literature to implement the best evidence-based practices. Therefore, here we performed a preliminary analysis to determine the reliability^f, responsiveness and criterion validities^g for canine pain assessment in a one-way crossover clinical trial in naturally occurring OA in dogs that were fed with two successive diets (control and therapeutic) during a 90-day period. We further hypothesized, first, that changes in measurements of the clinical endpoints (dependent variables) would arise from the diets (independent variable) with every other possible factor controlled and, second, that validated outcomes would correlate strongly to PVF as the primary outcome and MA as an exploratory outcome. This study determined the clinical utility of selected methods regardless of some technical validities.

3.4.5 Results

3.4.5.1 Animals

A total of 30 dogs were initially recruited. Seven dogs were excluded for the following reasons: three due to a sudden deterioration of their condition (one dog at D21 and two dogs at D45 and D52), three for a lack of owner follow-up, and one for NSAID use (at D40). The sample included 14 males and 9 females, and the most frequent breeds were Labrador (n = 7) and Golden Retrievers (n = 4). The remainder of the dogs were mixed-breeds (n = 3) and various pure-breeds (n = 9). The dogs were 2.5 to 11.5 years old (6 years, median) at the time of inclusion and weighed 25.2 to 68.4 kg [40.4 ± 1.8 kg]. The joint that caused the most lameness in each animal during the orthopedic examination was the hip (34.8%) followed by the stifle (30.4%), shoulder and elbow (13.0%, each), and carpus and tarsus (4.4% each). Joint

pathologies included hip dysplasia (39.1%), cranial cruciate ligament rupture (26.1%), elbow dysplasia (13.1%), shoulder osteochondritis dissecans (OCD) (13.0%), tarsus OCD, and carpus OA with no obvious origin (4.4% each).

3.4.5.2 Primary endpoints

3.4.5.2.1 Kinetic force platform gait analysis (PVF_{BW})

The mean CV for PVF_{BW} was not different over time ($P = 0.82$) (Table I). A significant effect of the anatomical location of the most affected limb on the PVF_{BW} was observed ($P < 0.001$). Moreover, the PVF_{BW} was significantly higher on D90 than on D0 ($P_{adj} = 0.0004$) and D30 ($P_{adj} = 0.003$) (Figure 1A). No differences between D0 and D30 were observed ($P_{adj} = 0.06$).

3.4.5.2.2 Client-specific outcome measures (CSOM)

The mean CV for CSOM was not different over time ($P = 0.34$) (Table I). The $CSOM_{Med}$ was higher on D0 than on D30 [odds ratio (OR): 3.8, 95% confidence interval (CI): 1.4 to 9.8, $P_{adj} = 0.03$] and on D90 [OR: 6.7, CI: 2.0 – 22.6, $P_{adj} = 0.006$] in the dogs with OA (Figure 1B). No difference between D30 and D90 was noted [OR: 1.8, CI: 0.7 – 5.0, $P_{adj} = 1.00$]. The ranked activities (Table II) revealed that the second ranked activity ($Act_{(2)}$) was significantly different between D0 and D30 [OR: 3.5, CI: 1.3 – 9.2, $P_{adj} = 0.04$] and D90 [OR: 8.7, CI: 2.2 – 34.1, $P_{adj} = 0.006$]. No differences over time were observed for the other ranked activities, which suggested that the ranking of the activities had no/poor influence.

The selected activities were categorized as follows: 41 activities were $Ctg_{(1)}$ (reduced mobility), 16 activities were $Ctg_{(2)}$ (reduced mobility after exercise), 12 activities were $Ctg_{(3)}$ (reduced ability to change posture), 10

activities were Ctg₍₄₎ (reduced ability to change posture after rest or in the morning), 4 activities were Ctg₍₅₎ (resistance to manipulations), and one activity was Ctg₍₆₎ (mood change). The Ctg₍₁₎ was higher on D0 than on D30 [OR: 2.7, CI: 1.4 – 5.3, P_{adj} = 0.02], but no difference was found between the other time points (Table II). The Ctg₍₂₎ was higher on D0 than on D30 [OR: 10.5, CI: 1.5 – 72.0, P_{adj} = 0.05] and on D90 [OR: 32.7, CI: 2.3 – 457.0, P_{adj} = 0.03] (Table II). The Ctg₍₄₎ revealed a significantly higher score on D0 than on D90 (Row Mean Score Difference, RMSD = 13.0, df = 1, P_{adj} = 0.04) (Table II). No differences over time were observed for Ctg₍₃₎ and Ctg₍₅₎ (Table II).

3.4.5.2.3 *Electrodermal activity (EDA)*

The mean CV for EDA was different over time ($P < 0.001$) (Table I), which suggested EDA was variable on repeated measurement throughout the study. This poor technical reliability precludes any interest in the use of the measurement for the assessment of treatment responsiveness. The EDA was not different on D0 compared with D30 (P_{adj} = 0.99) and D90 (P_{adj} = 0.90). No difference was observed between D30 and D90 (P_{adj} = 0.07) (Figure 1C).

3.4.5.3 **Criterion validities**

The pairwise correlation coefficients between the PVF_{BW} and the CSOM_{Med} were low (Spearman's rank correlation coefficient (rhoS) = -0.03, 0.10 and -0.37 on D0, D30 and D90, respectively) (Table III). Some relationship between the PVF_{BW} and the CSOM_{Med} appeared between D30 and D90 using the descriptive pairwise correlation coefficient (rhoS = -0.71) (Table III). The regression estimate between the PVF_{BW} and the CSOM_{Med} was significant (estimate (SE) = -0.01 (0.003), P = 0.02). These results

indicate that both variables are convergent and that the CSOM_{Med} change is predictive, in some part, of the PVF_{BW} change. The CSOM categories were presented as exploratory endpoints because they were *a posteriori* measures with interesting information (Table III). Descriptive correlations revealed that the CSOM categories reflected the CSOM_{Med}.

The pairwise correlation coefficient between the PVF_{BW} and the EDA indicated no linear relationship on D0, D30, and D90 or differences between D0 and D30 and D30 and D90 (Table III). Regression analyses demonstrated no relationship between the PVF_{BW} and the EDA (estimate (SE) = 0.001 (0.001), P = 0.91), which implies that EDA had no empirical association with PVF_{BW}.

3.4.5.4 Exploratory endpoints

3.4.5.4.1 Motor activity (MA)

The mixed model of MA recordings in the seven randomized dogs revealed a significant main effect for time (P = 0.04), age (P < 0.001) and daily period (P < 0.001) and time (P = 0.04). A significant effect of age was observed between dogs older than 6 years and younger dogs (minus 6 years) (P < 0.001) (Figure 2). A significant effect of the daily period on MA intensity was noted because the dogs were less active at night than during the morning (P = 0.002) or the afternoon (P < 0.001). The planned comparisons showed that MA intensity was lower at P1 compared to P6 (P_{adj} = 0.02) (Figure 2).

There was no pairwise correlation (Table III) and no relationship between the MA intensity and the PVF_{BW} (P = 0.36). No relationship between the MA intensity and the CSOM_{Med} (P = 0.79) was noted on the regression

analysis. However, there was a significant negative relationship between the MA duration and the CSOM_{Med} ($P = 0.02$).

3.4.5.4.2 Multifactorial pain questionnaire (MFQ)

The internal consistency of the MFQ-S ($n_{ij} = 69$, Cronbach's alpha = 0.59) and the MFQ-D ($n_{ij} = 69$, Cronbach's alpha = 0.69) were lower than expected, which suggested that the selected items were not related to the same construct¹.

Figure 3 illustrates that the MFQ-NRS score was 3.0 times (OR) higher on D30 than on D0 ($P_{adj} = 0.04$), which indicates deterioration in the dogs' condition. However, this score was unchanged from D0 to D90 ($P_{adj} = 0.60$) and from D30 to D90 ($P_{adj} = 0.27$). Moreover, the MFQ-S was lower on D30 ($P_{adj} = 0.003$) compared to on D0. No differences on D90 compared with D0 ($P_{adj} = 0.21$) or D30 ($P_{adj} = 0.75$) were noted for MFQ-S. Finally, the MFQ-D and the MFQ-RTx did not change over time ($P > 0.05$) (Figure 3). The divergent scoring of the MFQ subscales did not validate this standardized scale in the study.

3.4.6 Discussion

The present study represents the continued interest in the conceptual and technical validities of multiple methods for pain assessment in canine OA. The PVF, CSOM, and MA demonstrated convergent results for the detection of diet-induced changes. The PVF exhibited the best technical validity, and the CSOM and MA demonstrated moderate technical validity. However, the CSOM evaluating the dogs' day-to-day health status was found as related to the PVF and was primarily influenced by MA duration. The differences in the conceptual and technical validities suggested PVF, CSOM,

and MA did not provide the same information on OA pain and physical function, but importantly they should be used and interpreted as a whole.

This study demonstrated that the PVF showed responsiveness to a GLM-enriched diet effect on canine OA. The study confirmed that the kinetic force platform gait analysis is a useful outcome because of the relative ease of data acquisition and technical validity (Vasseur et al., 1995; Budberg, 2001; Moreau, et al., 2003; Conzemius et al., 2005; Trumble et al., 2005; Moreau et al., 2007; Moreau et al., 2011b). Interestingly, age, sex and radiographically estimated OA severity were not affecting PVF, and the value of PVF representing the most affected limb was an accurate outcome measure for OA. But it might only partially represent the consequences of the entire disease on the physical function in these selected dogs, with regards to the absence of relationship between PVF and MA.

Clinical owner-oriented outcomes would be conceptually preferred, in general, because they are expected to reflect a dog's quality of life. The questioning of the patient/owner about the quality of life has opened a wider panel of OA physical function and pain assessments. The CSOM is a subjective instrument that satisfied some psychometric qualities in this clinical trial. The owner-described behaviors in the CSOM were similar to previously described behaviors in canine studies of OA symptoms and pain (Hielm-Bjorkman et al., 2003; Lascelles et al., 2008). These similarities suggest the face validity of the CSOM, which indicates that this measurement assesses the appropriate outcome (Streiner and Norman, 2003). Reliability testing revealed that the owner's assessment was not variable over a one-week period. This is suggestive that CSOM scores were stable at the condition the dog's status did not change between these two successive CSOM assessments (when facing a change, it was expected the owner to alter

the investigators). With the conditions of the study, it was not possible to judge on a memory effect (the owner is influenced by the souvenir of the previous scoring) and the potential effect of a random error in CSOM owner assessment. Moreover, regression analyses demonstrated that both CSOM and PVF methods were related, supporting our second hypothesis. But, CSOM measurements were not strictly parallel to PVF (confirming our first hypothesis) as only the PVF detected a strict beneficial effect of the GLM diet. Divergent results between CSOM and PVF for the responsiveness analysis and the criterion validity analysis might be explained by the technical features of the CSOM. Indeed, the quantification scale of the CSOM is limited, likely decreasing its responsiveness. In addition, it was difficult to demonstrate a further decrease in the CSOM beyond D30 suggesting a possible floor effect. The sample size of 23 dogs was based on the power of the trial to detect a specified clinical benefit on the PVF. In the past, a sample size of 20 dogs ensured a difference of 4.2 %BW in the PVF consistent with an effect size of 0.9 could be detected assuming 80% power, a SD of 4.5 and a 5% significance threshold (Moreau et al., 2007). This sample size might be too weak to fully support GLM diet efficacy using CSOM. This result suggests that the CSOM would decrease the likelihood of false clinical benefits. In contrast, PVF was responsive to GLM effect. Whereas PVF demonstrated significant change between D30 and D90, the primary endpoint CSOM has not demonstrated a statistically significant change for the same interval time. This could look as controversial for the validity of the methods, Therefore, we applied a correction for multiplicity of endpoints that adjusted the Type I error when a significant result was required for more than one but not all multiple primary outcomes after correction of multiplicity (Turk et al., 2008). With the correction for multiplicity, PVF was significantly different

between D30 and D90. This method provided stronger evidence to fully characterize the metrological feature of the methods when a small treatment effect is anticipated. In addition, the study suggests the two methods complementary relationship in pain assessment in which the CSOM assessed pain-induced changes in behavior and locomotion, and the PVF analyzed kinetic gait changes.

Previous studies have not indicated the details of the construction of the CSOM (Lascelles et al., 2008). As previously noted, owners easily report on their dog's activities, but the number (from 5 to 3 activities) and the nature of the selected activities in the CSOM differed between users (Lascelles et al., 2007; Lascelles et al., 2008). This result suggests that OA has a variable impact on the daily life of dogs or that some owners missed behavioral changes that are caused by chronic pain (Hielm-Björkman et al., 2011). In this study, an analysis of the influence of each activity revealed that the ranking of activity was neither valid nor informative. However, the categorization of the activities demonstrated significant behavioral changes. The owners detected higher limitations in activity in their dogs after exercise (Ctg₍₂₎) or after a certain period of inactivity, including stiffness at night/after activity/in the morning (Ctg₍₄₎). These behaviors are events that concur with suggestions of pain signs in previous studies. Hence, the selection of the same number of activities (we suggest 2 to 3 activities) that are worded by the owner but selected from the present categories would allow more precise and sensitive comparisons between dogs in future studies.

Our findings reported a significant difference in MA from P1 to P6 (Figure 2). However, the graph clearly suggests the possibility to detect more frequent differences while taking account individual variability of these data (cf. the actual difference with age on this limited sample) and required sample

size to avoid Type II error. In addition, according to the small sample inference of the linear mixed model (Skene and Kenward, 2010), our result needs to be verified on larger sample size. Despite inference about the statistical inference, the present result about MA opened new insight in the field of pain evaluation for osteoarthritic dogs. Interestingly, MA did not significantly rely on PVF but to CSOM. These results emphasized that MA provided an aspect of spontaneous physical activity that was not detected by the conditioned gait evaluation, *i.e.* PVF. In addition, MA may be influenced by the proper ability of the dog to move freely and reflect its quality of life as defined by CSOM. Therefore, MA and CSOM are attractive outcome measures of pain and physical function in OA dogs because they are interrelated but different; one measurement is objective and the other is subjective.

The observed divergence in the results of the constitutive MFQ subscales (*e.g.*, MFQ-NRS and MFQ-S from D0 to D30), the lack of responsiveness (for MFQ-RTx and MFQ-D) and the weak internal consistency (particularly for MFQ-S) lead to poor technical validity and question the construct validity of this method. Although the CSOM and the MFQ were designed for clinical use to evaluate similar aspects of OA, the current results suggest that both pain scales partially reflect the same construct or that the MFQ did not satisfy adequate psychometric features. The standardized MFQ scale looked less potent to reflect the variability in limb impairment, activity limitations and other pain syndromes in canine OA.

The EDA measurement did not provide conclusive results in this clinical study. Invalidated outcome measures were observed in experimental conditions in rodents with a higher sympathetic tonus (Richardson et al.,

2007), but our own group has reported positive results with its use in the experimental (Pond-Nuki) canine OA model (Moreau et al., 2011b).

The GLM-enriched diet and the GLM extracts although not a reference treatment for OA were shown to exert a positive therapeutic effect on the clinical signs of dog OA (Pollard et al., 2006; Hielm-Bjorkman et al., 2009b). Although a placebo-controlled trial would have been favored, ethical issues precluded a parallel comparison over 60 days between GLM- and placebo-treated dogs. Therefore, only a longitudinal one-way crossover design was included in the experimental design using the dogs as their own control. The anticipated effect of the GLM-diet was weak (Pollard et al., 2006; Hielm-Bjorkman et al., 2009b). We do not know how much difference should be seen after two months of giving GLM. In addition, we observed slight improvement from D0 to D30 for CSOM, and MA seemed to be better after the first 14 days after changing food the home food for the control food. Previous studies reported better owner-assessed pain in OA dogs with diet change (Fritsch et al., 2010; Roush et al., 2010). Altogether, it is possible that the changes were not resulting from the GLM-diet but might be representing a trend over time caused by the diet changes (Roush et al., 2010). Some might argue that PVF was not a good indicator of pain (or, at least claim that PVF is less sensitive than vertical impulse for hip dysplasia condition). As other critic in the present study, we could mention the fact that the other methods, i.e. MFQ and EDA, did not detect any treatment effect over the GLM-diet period. However, the sensitivity of MFQ and EDA was not previously investigated in other OA related-pain study in clinical condition, whereas the vertical ground reaction forces, such as PVF, have already proven their ability to detect change with NSAIDs treatment (Vasseur et al., 1995; Budberg et al., 1999; Moreau et al., 2003; Moreau et al., 2007).

3.4.7 Conclusions

This study investigated outcome measures that assessed signs in naturally occurring OA in dogs. The data from this study demonstrated that the limitation in activities (CSOM) and physical function, including limb impairment (PVF) and physical activity (MA), acted as complementary measures. Further developments on CSOM and MA would optimize their use in clinical trials.

3.4.8 Methods

3.4.8.1 Animals

The Institutional Animal Care and Use Committee approved the experimental protocol (Rech-1297) following the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Thirty dogs were selected at the University teaching hospital of the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada). The selection criteria were the following: 1) chronic and stable lameness, as reported by the owner; 2) no pregnancy and obesity; 3) weight greater than 20 kg (44 lb) and age greater than 12 months; 4) freedom from non-OA orthopedic, neurological and other abnormalities; 5) lack of orthopedic surgical treatments in the past year; and 6) no treatment with OA prescription-type diets, fatty acid supplements, continuous oral or injectable anti-inflammatory drugs that were prescribed by a veterinarian (including both steroid and NSAID), or polysulfated glycosaminoglycans therapy. Dogs that were receiving an oral nutraceutical or sporadic NSAID administration underwent a 4-week withdrawal period to establish eligibility.

When expressed as a percentage of their body weight (%BW), a PVF lower than 99.1% BW for forelimb lameness or lower than 62.2% BW for the lameness of one or more hindlimbs was required for inclusion, as previously performed (Moreau et al., 2010). An experienced veterinary surgeon performed an orthopedic exam and reviewed the digital radiographs of hips, stifles, and elbows for signs of OA. Physical examination, biochemical and hematological analyses (CBC, chemistry panel, and urine analysis) were performed on each dog. These were done to exclude non-healthy animals that presented non-OA orthopedic, neurological or other abnormalities. Dogs were removed from the study if either of the following conditions occurred: 1) the administration of a recognized treatment for OA, 2) medical problems or a sudden deterioration in orthopedic condition, 3) decision by the owner or 4) a change in housing style.

3.4.8.2 Study design

All the dogs were fed a standard balanced diet of adult dry food (Dog Chow®, Nestlé Purina, St.-Louis, MO, USA) from D0 to D30 to standardize the food regimen for use as a placebo-control. This dog chow did not include any proclaimed active ingredients for the treatment or alleviation of OA. Subsequently, all the dogs were fed an experimental therapeutic food that was enriched in green-lipped mussel (GLM) from D31 to D90 (Mobility Support JS®, Medi-Cal/Royal Canin, Guelph, ON, Canada). The latter diet was chosen for its potent pain relief activity (Bui and Bierer, 2003; Hielm-Bjorkman et al., 2009b) without the side effects that are induced by the long-term administration of NSAIDs (Lascelles et al., 2005; Vangsnæs et al., 2009). The packaging of both diets was identical. The pet owners and the investigators in the field had no knowledge of the food identity and in what

order the diets were fed. The food composition and the daily food needs all met the recommendations of the Association of American Feed Control Officials for the maintenance of adult dogs (AAFCO, 2003). The pet owners were instructed to transition their dogs to the assigned foods as following: a 14 transition day period at D0-D14 and at D30-D44.

The dogs remained at home throughout the study. The pain CSOM questionnaire and MA were recorded within the dog's environment. The others methods were performed on D0, D30 and D90 at the University teaching hospital.

3.4.8.3 Primary endpoints

3.4.8.3.1 Kinetic force platform gait analysis (PVF_{BW})

Data acquisition for the PVF was obtained for a trot at a constant velocity between 1.9 and 2.2 m/sec on a biomechanical force platform (Model OR6-6®; Advanced Medical Technology Inc., Watertown, MS, USA) coupled to software (Vetforce®; Sharon Software, Dewitt, MI, USA) as described previously (Moreau et al., 2010). The lowest PVF determined the most severely affected limb, which was selected for evaluation and used throughout the entire study. Five valid trials were recorded for the selected limb and averaged for further analyses. As recently reported by our group, PVF adjusted for individual BW changes (PVF_{BW}) was used for the analyses (Moreau et al., 2010).

3.4.8.3.2 Client-specific outcome measures (CSOM)

The CSOM scale is an owner-specific instrument to assess the influence of OA on the dog's behavior (Gingerich and Strobel, 2003). A veterinarian assisted the owners at baseline, and the owners determined the

five most difficult/OA-affected activities [Act_(i)] for their dog. The evaluation of fewer than five activities was permitted. The owners ranked the activities by the level of importance from Act₍₁₎ to Act₍₅₎. Each activity was scored from 0 (no problem) to 4 (greatest difficulty) on a five-point Likert-rating scale. The median value of all the activity scores (CSOM_{Med} = Median [Act_(i)]) ranged from 0 (no problem/pain) to 4 (greatest difficulty/pain). Each owner completed the CSOM twice per week. The activities were also subjectively clustered into six categories [Ctg_(i)] to provide a description of the activity limitations induced by OA: Ctg₍₁₎ = Reduced mobility; Ctg₍₂₎ = Reduced mobility after exercise; Ctg₍₃₎ = Reduced ability to change posture; Ctg₍₄₎ = Reduced ability to change posture after rest or in the morning; Ctg₍₅₎ = Resistance to manipulations; and Ctg₍₆₎ = Mood change. If more than one selected activity was included in the same category, a median value of these scored activities was used to score the category.

3.4.8.3.3 *Electrodermal activity (EDA)*

An EDA measurement was performed using the Pain Gauge system® (PHIS Inc., Dublin, OH, USA) to reflect sympathetic responses related to stress and pain. Both electrodes of the device were applied on a dry right hind paw for two seconds. The instrument displays a numeric level of skin conductance that ranged from 0.1 (no pain, no stress) to 9.9 (worst pain and stress). The measurements were performed in triplicate on D0, D30 and D90. The data were averaged at each time point for the statistical analyses.

3.4.8.4 Exploratory endpoints

3.4.8.4.1 *Motor activity (MA)*

Accelerometer microchips (Actical® Mini Mitter, Bio-Lynx Scientific Equipment, Inc., Laval, QC, Canada) continuously recorded MA for 12 weeks on seven randomly selected dogs. These microchips are recent introductions in clinical studies, and we were interested in an *a priori* assessment of the technical validity of this tool in a limited sample. The sensor was placed on a neck collar. The epoch length of the count acquisition was set at 2 min. The intensity of the MA for each count was recorded and translated to numerical values (no unit). The data recorded at D0, D30 and D90 were externally excluded from analyses because they did not represent the true MA as the dogs were handled at the clinic. To reach the same interval of time for analysis, we excluded too D15, D45, D60 and D75. Therefore, data are represented in six consecutive periods ($P_{(i)}$) of 14-day average total intensities. Three daily time periods (night from 20:00 to 07:00 h; morning from 07:02 to 13:00 h; and afternoon from 13:02 to 19:58 h) were established to stabilize data variability in further analyses. Moreover, the duration of MA was assessed over each 14-day period as the number of nonzero intensity counts.

3.4.8.4.2 *Multifactorial pain questionnaire (MFQ)*

An MFQ scale supporting OA disease-specific measures was designed, based on the content validity of previous reports (Hielm-Bjorkman et al., 2003; Hudson et al., 2004; Wiseman-Orr et al., 2006; Brown et al., 2007). Item selection and scale construction produced four subscales. The MFQ-Numerical Rating Scale (MFQ-NRS) is a five-point Likert scale (0–4) with 0 representing no pain and 4 the most excruciating pain perceived in

dogs. The MFQ-Static (MFQ-S) scale was expected to measure the retrospective emotional functioning of the owner toward his/her OA-afflicted dog (Annex 1). The MFQ-Dynamic (MFQ-D) scale measured prospective physical functioning (Annex 2). Finally, the MFQ-Response to Treatment (MFQ-RTx) scale reported the satisfaction of treatment through a simple descriptive scale ranging from really better (-2); lightly better (-1); no change (0); lightly worse (1); to really worse (2).

3.4.8.5 Statistical analyses

3.4.8.5.1 Reliability

Variability in data outcome for the repeated measures was determined at each time-point, for each dog by calculating the mean coefficient of variation (CV), as previously performed (Budsberg, 2001). The CV was calculated as the ratio of the standard deviation to the mean of the repeated measurements for the PVF (n = 5 at each time-point), the CSOM (n = 2 per week) and the EDA (n = 3 at each time point). For the CSOM, two values of the Act_(i) sum in the same week were considered as duplicates, and these values were used for the dispersion analysis. This analysis was compulsory for the CSOM_{Med} value distribution to approximate zero, which might mislead the CV. A mixed model analysis was used to compare changes in mean CV over time to estimate if the dispersion of the repeated measures were not different at each pointing time. The later was considered as good when time did not exert a significant effect in the model, finally, the internal consistency of the MFQ-S and the MFQ-D was assessed by the calculation of Cronbach's alpha. The threshold for good interrelatedness among items was set at > 0.7 (Streiner and Norman, 2003).

3.4.8.5.2 Responsiveness

Our analyses examined the responsiveness of the PVF and MA methods using a mixed-model method for repeated measures with time as fixed effect and subject as random effect, and provided fixed effect estimates by restricted likelihood modeling. The homogeneity of the variance assumption using the probabilities of Levene's test was provided for each time. Normality distribution was confirmed using the Shapiro-Wilk test. Log-transformation was performed to fit normality when required. For covariance structure selection, we used goodness-of-fit statistics to compare models with the same fixed effects but different covariance structure. Also, normality and homogeneity of the variance of the models' residuals were checked to assess the model validity (Littell et al., 2000; Littell et al., 2006). A multinomial logistic regression for repeated measures analyzed the CSOM_{Med}, Act_(i), Ctg_(i), and MFQ subscales as discrete dependent variables. The Cochran-Mantel-Haenszel test was applied when the statistical model did not fit the assumptions of the multinomial logistic regression approach. A Poisson regression assessed EDA and the duration of activity (*i.e.*, the number of active MA counts). We addressed missing data using pairwise deletion. When required, factors such as age at inclusion (plus or minus 6 years), sex (male or female), the anatomical location of the most affected limb (cranial or caudal leg), and the severity of the OA lesion based on the number of joints diagnosed by radiography, were tested in the statistical models. Another factor as the daily time periods (night, morning, afternoon) was also tested for MA. Only the significant factors were included in the final statistical models.

3.4.8.5.3 *Criterion validities*

The descriptive statistics of the Spearman Rank correlation coefficient and their 95% interval confidence at the CSOM, EDA, MA endpoints were summarized by referencing their values to the PVF_{BW} at D0, D30 and D90 to assess concurrent validity^h. The estimated 95% confidence limits represented the 25th and 975th rank-ordered values from the 1000 bootstrap resampling of 23 dogs (Haukoos and Lewis, 2005). For predictive validityⁱ, we first described the magnitude of the systematic differences of the same outcomes between D0 and D30 and D30 and D90. Hence, the inferential statistics using regression analyses were performed to assess the relationship of the PVFBW to the CSOM, the EDA and MA at the three time points. A regression analysis of the CSOM and MA was also performed on the continuous recordings of the seven dogs.

Statistical analyses were performed using the GLIMMIX and MIXED procedures in the SAS software (version 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC). The α -level of significance was set at 5%. For the correction of the multiplicity of the clinical endpoints (PVF, CSOM, and EDA), the significant level of the statistical models were set at the $\alpha/(k)$ level, where an α of 0.05 is the original Type I error, and k is the number of primary endpoints to be performed (Turk et al., 2008). As a result, the corrected Type I error probability was set at $0.05/3 = 0.017$ for the Type 3 tests, which tested for the significance of each of the fixed effects specified in each model. When the statistical model result yielded significant main effect for time, Bonferroni's adjustment was applied at the 5% α -threshold for post-hoc repeated measures of the same method (adjusted P-value cited as P_{adj}). Descriptive statistics of the measured outcomes at each time are presented as the mean \pm SEM and the median (25th to 75th rank-ordered values) for the ordinal data.

3.4.9 List of abbreviations

Act_(i): Activity “i”; BW: Body weight; Ctg_(i): Category “i”; CSOM: Client-specific outcome measures; GLM: Green-lipped mussel; NSAID: Non-steroidal anti-inflammatory drug; PVF_{BW}: Body weight change-adjusted peak vertical force; MA: Motor activity

3.4.10 Competing interests

All authors declare no competing interest in this publication.

3.4.11 Author contributions

- Conception and design: MM, BL, JPP, JMP, ET.
 - Acquisition and interpretation of the data: SB, PR, MM, BL, JPP, ET.
 - Collection and assembly of data: PR, SB, MM, BL, JPP, ET.
 - Provision of study materials or patients: SB, MM, BL.
 - Statistical expertise: PR, MG, ET.
 - Drafting the article: PR, SB, ET.
 - Critical revision of the article for important intellectual content: All authors.
 - Final approval of the article: All authors.
 - Acquisition of funding: ET, BL.
 - Administrative, technical, or logistic support: PR, SB, MM, MG, ET.
- ET takes the responsibility for the integrity of the work as a whole.

3.4.12 Authors' information

ET is actual Chair of the Non-Human Species – Special Interest Group of the International Association for the Study of Pain (<http://www.iasp-pain.org/SIGs/NonHuman/>), member of the Research and Education Committee of the International Veterinary Academy of Pain Management (<http://www.ivapm.org/>) as well as founding member and secretary of the 4AVET association (<http://www.4avet.org>).

3.4.13 Acknowledgments

The authors are grateful to Mrs. Anne-Andrée Mignault and Katherine Bernier, for clinical assistance and technical expertise, Guy Beauchamp for the statistical analyses. This study was supported by an unrestricted operating grant (BL, ET) from Medi-Cal/Royal Canin Canada, Inc.; an ongoing New Opportunities Fund grant (ET) from the Canada Foundation for Innovation (#9483); and a Discovery grant (ET) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#327158-2008).

3.4.14 Endnotes – Glossary

^a Conceptual validity is the a priori acceptance that the attribute (or scientific construct, i.e. canine osteoarthritic pain in our case) to be measured produces variations in the measurement outcomes (i.e. pain scales in the actual context). It refers to an ideal outcome that directly measures an important change in the patients' health status that is the result of the study intervention. ^b Technical validity is the evidence base for technical properties of the methods including intra- and inter-reliability, and (a number of different forms of) validity. ^c Psychometrics is the field of study consisting in

a single psychological attribute (i.e. animal pain) measurement (metrology) with one or multiple items (i.e. behavioral characteristics as part of pain expression) and establishing the validation of the developed measurement method by referencing to its technical validity (also cited as psychometric features).^d Sensitivity is the ability to detect differences between subjects (or subjects between groups).^e Responsiveness is the ability to detect a change when a subject improves or deteriorates.^f Reliability concerns the random variability associated with the measurements. Reliability testing consists in determining that results are consistent across repeated measures over time and by different observers. Internal consistency is part of the assessment of the reliability in multi-item scales as it tests the homogeneity of the content of a composite scale.^g Criterion validities assess an instrument against a criterion measure known to be valid (also called “true value” or “gold standard”). Criterion validity could be^h concurrent validity, which involves a parallel comparison of the new instrument against a well-established method, orⁱ predictive validity, which usually makes a prediction of future test results. A^j construct is an explanatory variable, which is not directly observable and is constructed from a theoretical concept (see a).^k Face validity refers to the degree of symptomatic resemblance between the developed instrument or outcome measurement and the intended topic or clinical condition.^l Construct validity refers to the degree to which a developed instrument measures the scientific construct that is designed to measure.

3.4.15References

AAFCO, Ed. (2003). Official Publication (Association of American Feed Control Officials). Official publication. Oxford.

- Brandt KD, Dieppe P, Radin EL (2008). Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 34(3): 531-559.
- Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT (2007). Development and psychometric testing of an instrument designed to measure chronic pain in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res* 68(6): 631-637.
- Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT (2008). Ability of the Canine Brief Pain Inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 233(8): 1278-1283.
- Brown DC, Boston RC, Farrar JT (2010). Use of an activity monitor to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 237(1): 66-70.
- Budsberg SC (2001). Long-term temporal evaluation of ground reaction forces during development of experimentally induced osteoarthritis in dogs. *Am J Vet Res* 62(8): 1207-1211.
- Budsberg SC, Johnston SA, Schwarz PD, DeCamp CE, Claxton R (1999). Efficacy of etodolac for the treatment of osteoarthritis of the hip joints in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 214(2): 206-210.
- Bui LM, Bierer TL (2003). Influence of green lipped mussels (*Perna canaliculus*) in alleviating signs of arthritis in dogs. *Vet Ther* 4(4): 397-407.
- Clements DN, Carter SD, Innes JF, Ollier WER (2006). Genetic basis of secondary osteoarthritis in dogs with joint dysplasia. *Am J Vet Res* 67(5): 909-918.
- Conzemius MG, Evans RB, Besancon MF, Gordon WJ, Horstman CL, Hoefle WD, Nieves MA, Wagner SD (2005). Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 226(2): 232-236.
- Dray A, Read S (2007). Arthritis and pain. Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther* 9(3): 212.

- Fritsch DA, Allen TA, Dodd CE, Jewell DE, Sixby KA, Leventhal PS, Brejda J, Hahn KA (2010). A multicenter study of the effect of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on carprofen dosage in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 236(5): 535-539.
- Gingerich DA, Strobel JD (2003). Use of client-specific outcome measures to assess treatment effects in geriatric, arthritic dogs: controlled clinical evaluation of a nutraceutical. *Vet Ther* 4(4): 376-386.
- Goldring SR (2008). The role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Rheum Dis Clin North Am* 34(3): 561-571.
- Gordon WJ, Conzemius MG, Riedesel E, Besancon MF, Evans R, Wilke V, Ritter MJ (2003). The relationship between limb function and radiographic osteoarthrosis in dogs with stifle osteoarthrosis. *Vet Surg* 32(5): 451-454.
- Hansen BD, Lascelles BDX, Keene BW, Adams AK, Thomson AE (2007). Evaluation of an accelerometer for at-home monitoring of spontaneous activity in dogs. *Am J Vet Res* 68(5): 468-475.
- Haukoos JS, Lewis RJ (2005). Advanced Statistics: Bootstrapping Confidence Intervals for Statistics with “Difficult” Distributions. *Acad Emerg Med* 12(4): 360-365.
- Hielm-Björkman AK, Kapatkin AS, Rita HJ (2011). Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dogs. *Am J Vet Res* 72(5): 601-607.
- Hielm-Bjorkman AK, Kuusela E, Liman A, Markkola A, Saarto E, Huttunen P, Leppaluoto J, Tulamo R-M, Raekallio M (2003). Evaluation of methods for assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222(11): 1552-1558.
- Hielm-Bjorkman AK, Rita H, Tulamo R-M (2009a). Psychometric testing of the Helsinki chronic pain index by completion of a questionnaire in Finnish

- by owners of dogs with chronic signs of pain caused by osteoarthritis. *Am J Vet Res* 70(6): 727-734.
- Hielm-Bjorkman AK, Tulamo R-M, Salonen H, Raekallio M (2009b). Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part I: Green-lipped Mussel (*Perna canaliculus*). *Evid Based Complement Alternat Med* 6(3): 365-673.
- Hielm-Bjorkman AK, Tulamo R-M, Salonen H, Raekallio M (2009c). Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part II: A Homeopathic Combination Preparation (Zeel(R)). *Evid Based Complement Alternat Med* 6(4): 465-471.
- Hudson JT, Slater MR, Taylor L, Scott HM, Kerwin SC (2004). Assessing repeatability and validity of a visual analogue scale questionnaire for use in assessing pain and lameness in dogs. *Am J Vet Res* 65(12): 1634-1643.
- Johnston SA (1997). Osteoarthritis: joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27: 699-723.
- Lascelles BD, McFarland JM, Swann H (2005). Guidelines for safe and effective use of NSAIDs in dogs. *Vet Ther* 6(3): 237-251.
- Lascelles BDX, Bernie DH, Simon R, Venita D, Andrea T, Courtney CP, Eric SS, Elizabeth R (2007). Evaluation of Client-Specific Outcome Measures and activity monitoring to measure pain relief in cats with osteoarthritis. *J Vet Intern Med* 21(3): 410-416.
- Lascelles BDX, Gaynor JS, Smith ES, Roe SC, Marcellin-Little DJ, Davidson G, Boland E, Carr J (2008). Amantadine in a multimodal analgesic regimen for alleviation of refractory osteoarthritis pain in dogs. *J Vet Intern Med* 22(1): 53-59.
- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberber O (2006). *SAS for Mixed Models*. Cary, N.C, SAS Publishing.

- Littell RC, Pendergast J, Natarajan R (2000). Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat Med* 19(13): 1793-1819.
- Moreau M, Dupuis J, Bonneau NH, Desnoyers M (2003). Clinical evaluation of a nutraceutical, carprofen and meloxicam for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 152(11): 323-329.
- Moreau M, Lussier B, Doucet M, Vincent G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2007). Efficacy of licofelone in dogs with clinical osteoarthritis. *Vet Rec* 160(17): 584-588.
- Moreau M, Lussier B, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Bédard C, Gauvin D, Troncy E (2012). *Brachyostemma calycinum* D. Don effectively reduces the locomotor disability in dogs with naturally occurring osteoarthritis: a randomized placebo-controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 9.
- Moreau M, Rialland P, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, Caron J, Frank D, Lussier B, del Castillo JRE, Beauchamp G, Gauvin D, Bertaim T, Thibaud D, Troncy E (2011). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 13(3): R98.
- Moreau M, Troncy E, Bichot S, Lussier B (2010). Influence of changes in body weight on peak vertical force in osteoarthritic dogs: a possible bias in study outcome. *Vet Surg* 39(1): 43-47.
- Pollard B, Dixon D, Dieppe P, Johnston M (2009). Measuring the ICF components of impairment, activity limitation and participation restriction: an item analysis using classical test theory and item response theory. *Health Qual Life Outcomes* 7(1): 41.
- Pollard B, Guilford WG, Ankenbauer-Perkins KL, Hedderley D (2006). Clinical efficacy and tolerance of an extract of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) in dogs presumptively diagnosed with degenerative joint disease. *N Z Vet J* 54(3): 114-118.

- Richardson CA, Niel L, Leach MC, Flecknell PA (2007). Evaluation of the efficacy of a novel electronic pain assessment device, the Pain Gauge, for measuring postoperative pain in rats. *Lab Anim* 41(1): 46-54.
- Roush JK, Cross AR, Renberg WC, Dodd CE, Sixby KA, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA (2010). Evaluation of the effects of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on weight bearing in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 236(1): 67-73.
- Rumph PF, Kincaid SA, Visco DM, Baird DK, Kammermann JR, West MS (1995). Redistribution of vertical ground reaction force in dogs with experimentally induced chronic hindlimb lameness. *Vet Surg* 24(5): 384-389.
- Skene SS, Kenward MG (2010). The analysis of very small samples of repeated measurements II: A modified Box correction. *Stat Med* 29(27): 2838-2856.
- Smith GK, Mayhew PD, Kapatkin AS, McKelvie PJ, Shofer FS, Gregor TP (2001). Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German Shepherd Dogs, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, and Rottweilers. *J Am Vet Med Assoc* 219(12): 1719-1724.
- Streiner DL, Norman GR (2003). *Health measurement scales: a practical guide to their development and use*. New York, Oxford University Press.
- Trumble TN, Billingham RC, Bendele AM, McIlwraith CW (2005). Evaluation of changes in vertical ground reaction forces as indicators of meniscal damage after transection of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am J Vet Res* 66(1): 156-163.
- Turk DC, Dworkin RH, McDermott MP, Bellamy N, Burke LB, Chandler JM, Cleeland CS, Cowan P, Dimitrova R, Farrar JT, Hertz S, Heyse JF, Iyengar S, Jadad AR, Jay GW, Jermano JA, Katz NP, Manning DC, Martin S, Max MB, McGrath P, McQuay HJ, Quessy S, Rappaport BA,

- Revicki DA, Rothman M, Stauffer JW, Svensson O, White RE, Witter J (2008). Analyzing multiple endpoints in clinical trials of pain treatments: IMMPACT recommendations. *Pain* 139(3): 485-493.
- Vangsness Jr CT, Spiker W, Erickson J (2009). A Review of Evidence-Based Medicine for Glucosamine and Chondroitin Sulfate Use in Knee Osteoarthritis. *Arthroscopy* 25(1): 86-94.
- Vasseur PB, Johnson AL, Budberg SC, Lincoln JD, Toombs JP, Whitehair JG, Lentz EL (1995). Randomized, controlled trial of the efficacy of carprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in the treatment of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 206(6): 807-811.
- Wilson AC, Palermo TM (2012). Physical Activity and Function in Adolescents With Chronic Pain: A Controlled Study Using Actigraphy. *J Pain* 13(2): 121-130.
- Wiseman-Orr ML, Scott EM, Reid J, Nolan AM (2006). Validation of a structured questionnaire as an instrument to measure chronic pain in dogs on the basis of effects on health-related quality of life. *Am J Vet Res* 67(11): 1826-1836.

3.4.16 Tables

Table I- Mean dog coefficient of variation^a on the primary clinical endpoints^b

| Variable | D0 | D30 | D90 | Time effect^c |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| | Mean (SD) | Mean (SD) | Mean (SD) | F Value (P) |
| PVF_{BW} | 3.9 (2.2) | 3.6 (1.8) | 4.0 (3.2) | 0.19 (0.82) |
| CSOM | 11.3 (16.3) | 5.7 (12.1) | 3.9 (10.5) | 0.94 (0.34) |
| EDA | 15.6 (14.4) | 11.4 (12.7) | 10.7 (8.6) | 16.76 (< 0.001) |

^a Coefficient of variation (CV) is calculated as the ratio of the standard deviation to the mean. ^b PVF_{BW}: peak vertical ground reaction force adjusted for body weight change; CSOM: client-specific outcome measures; EDA: electrodermal activity. Descriptive data are represented as mean (SD). ^c The mean intradog CV were considered not variable at each time point, when time did not exert a significant effect at P-value higher than 0.05.

Table II - Client-specific outcome measures (CSOM)

| | Time | Median (range) | Statistical comparison | OR (95% LCL – UCL) | Chi square | P |
|----------------------------------|------|----------------|------------------------|--------------------|------------|---------------|
| Act₍₁₎ | D0 | 2 (0 – 4) | D0 vs. D30 | 2.6 (1.0 – 6.9) | 4.9 | 0.04 |
| | D30 | 1 (1 – 3) | D0 vs. D90 | 5.3(1.3 – 21.3) | 5.5 | 0.019 |
| | D90 | 1 (0 – 3) | D30 vs. D90 | 1.9(0.5 – 7.1) | 1.1 | 0.29 |
| Act₍₂₎ | D0 | 2 (1 – 4) | D0 vs. D30 | 3.5*(1.3 – 9.2) | 6.4 | 0.011 |
| | D30 | 2 (0 – 4) | D0 vs. D90 | 8.7*(2.2 – 34.1) | 9.7 | 0.0018 |
| | D90 | 1 (0 – 2) | D30 vs. D90 | 2.5(0.8 – 6.9) | 3 | 0.08 |
| Act₍₃₎ | D0 | 2 (1 – 3) | D0 vs. D30 | 1.8(0.8 – 4.2) | 2.0 | 0.15 |
| | D30 | 2 (0 – 3) | D0 vs. D90 | 2.8(0.9 – 8.4) | 3.3 | 0.06 |
| | D90 | 1 (0 – 4) | D30 vs. D90 | 1.5(0.4 – 5.0) | 0.5 | 0.47 |
| Act₍₄₎ | D0 | 2 (1 – 4) | D0 vs. D30 | 2.0(0.8 – 4.7) | 2.5 | 0.10 |
| | D30 | 2 (0 – 4) | D0 vs. D90 | 4.2(1.1 – 16.2) | 4.4 | 0.03 |
| | D90 | 2 (0 – 4) | D30 vs. D90 | 2.1(0.7 – 5.9) | 2.0 | 0.15 |
| Act₍₅₎ CMH | D0 | 2 (1 – 3) | D0 vs. D30 | – | 9.1 | 0.02 |
| | D30 | 2 (0 – 3) | D0 vs. D90 | – | 7.5 | 0.05 |
| | D90 | 1 (0 – 3) | D30 vs. D90 | – | 3.5 | 0.17 |
| Ctg₍₁₎ | D0 | 2 (1 – 4) | D0 vs. D30 | 2.7*(1.4 – 5.3) | 8.3 | 0.004 |
| | D30 | 2 (0 – 2) | D0 vs. D90 | 2.6(1.7 – 6.6) | 4.6 | 0.03 |
| | D90 | 1 (0 – 3) | D30 vs. D90 | 0.9(0.4 – 2.1) | 0.4 | 0.97 |
| Ctg₍₂₎ | D0 | 2.5 (0 – 3) | D0 vs. D30 | 10.5*(1.5 – 72.0) | 5.7 | 0.016 |
| | D30 | 2 (0 – 2) | D0 vs. D90 | 32.7*(2.3 – 457.0) | 6.7 | 0.009 |
| | D90 | 1 (0 – 2) | D30 vs. D90 | 3.1(0.7 – 13.3) | 2.3 | 0.12 |
| Ctg₍₃₎ | D0 | 2 (1 – 4) | D0 vs. D30 | 0.8(0.3 – 2.3) | 0.1 | 0.73 |
| | D30 | 2 (1 – 4) | D0 vs. D90 | 0.6(0.2 – 1.6) | 0.8 | 0.35 |
| | D90 | 2 (0 – 3) | D30 vs. D90 | 0.2(0.2 – 4.7) | 0.09 | 0.76 |
| Ctg₍₄₎ | D0 | 2 (2 – 2) | D0 vs. D30 | – | 4.1 | 0.25 |

| | | | | | | |
|--------------------------|-----|-------------|-------------|---|-------|--------------|
| CMH | D30 | 2 (1 – 2) | D0 vs. D90 | – | 13.0* | 0.011 |
| | D90 | 1 (0 – 2) | D30 vs. D90 | – | 6.6 | 0.08 |
| Ctg₍₅₎ | D0 | 2 (2 – 3) | D0 vs. D30 | – | 0.11 | 0.73 |
| CMH | D30 | 1.5 (1 – 2) | D0 vs. D90 | – | 0.55 | 0.45 |
| | D90 | 1 (1 – 2) | D30 vs. D90 | – | 0.11 | 0.73 |

Selected activities, Act₍₁₎ to Act₍₅₎ ranked by decrescendo order of importance by owner. Selected behavioural categories, Ctg₍₁₎: Reduced mobility; Ctg₍₂₎: Reduced mobility after exercise; Ctg₍₃₎: Reduced ability to change posture; Ctg₍₄₎: Reduced ability to change posture after rest or in the morning; Ctg₍₅₎: Resistance to manipulations. LCL: lower control limit; UCL: upper control limit. Multinomial logistic regression for repeated measures: *significant odds ratio (OR). Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) test: ♦significant row mean scores difference (RMSD). Estimates were significant P-value (P) lower than 0.017 with Bonferroni's adjustment

Table III - Spearman's rank correlation coefficient of PVF_{BW} in comparison with measures^a

| Comparison of PVF _{BW} with: | n | D0 (95% CI) | D30 (95% CI) | D90 (95% CI) | Difference D0D30 (95% CI) | Difference D30D90 (95% CI) |
|---------------------------------------|----|-------------------|------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Primary endpoints | | | | | | |
| CSOM ^a | 23 | -0.03 (-.64, .32) | .10 (-.38, .57) | -.37 (-.74, .12) | .13 (-.44, .66) | -.71 (-.91, -.34) |
| EDA | 23 | -.23 (-.61, .24) | .10 (-.44, .60) | .16 (-.36, .62) | -.12 (-.60, .43) | .31 (-.23, .69) |
| Exploratory endpoints | | | | | | |
| MA | 7 | -.46 (-1.0, .77) | .10 (-1.0, 1.0) | .45 (-.68, 1.0) | -.04 (-.94, 1.0) | .14 (-1.0, 0.80) |
| Ctg ₍₁₎ | 20 | -.20 (-.65, .42) | -.29 (-.66, .21) | -.13 (-.58, .40) | -.03 (-.67, .74) | -.64 (-.87, -.15) |
| Ctg ₍₂₎ | 10 | .01 (-.77, .78) | .00 (-.77, .79) | -.75 (-1.0, 0.00) | -.03 (-.81, .74) | -.52 (-.90, .45) |
| Ctg ₍₃₎ | 9 | .56 (-.72, 1.0) | .54 (-.31, 1.0) | .52 (-.81, 1.0) | .00 (-.91, .92) | -.99 (-1.0, -.87) |
| Ctg ₍₄₎ | 8 | .20 (-.44, .94) | .09 (-.91, 1.0) | .07 (-.91, 1.0) | .20 (-.94, 1.0) | -.66 (-1.0, .71) |

PVF_{BW}: peak vertical ground reaction force adjusted for body weight change. CSOM: client-specific outcome measures; EDA: electrodermal activity; MA: motor activity; Ctg₍₁₎: Reduced mobility; Ctg₍₂₎: Reduced mobility after exercise; Ctg₍₃₎: Reduced ability to change posture; Ctg₍₄₎: Reduced ability to change posture after rest or in the morning. Descriptive data are represented as Spearman's rank correlation coefficient at day(D)0, D30, D90, difference between D0 and D30 (D0D30), and difference between D30 and D90 (D30D90). 95% CI: 95% confidence interval from bootstrap method of sample of n dogs (1000 samples randomly selected with replacement). NA : Not available.

3.4.17 Figure legends

Figure 1 - Evolution of primary clinical endpoints in osteoarthritic dogs fed subsequently with control and green-lipped mussel-enriched diets. A) PVF_{BW} : Peak vertical ground reaction force adjusted to change in body weight (%BW). B) $CSOM_{Med}$: Box plot of the median-value of client-specific outcome measures (score). C) EDA: electrodermal activity.

Data are represented as mean \pm SEM for PVF_{BW} and EDA, and as median + 75th percentile for $CSOM_{Med}$ at day(D)0, D30, and D90. General linear mixed model for repeated measures: (a) and (b) were significant difference of Least Squares Means when compared with D0 and D30, respectively. Multinomial logistic regression for repeated measures: *significant odds ratio (when compared to D0). Significance was reached at P-value lower than 0.017 with Bonferroni's adjustment.

Figure 2 - Evolution of motor activity in osteoarthritic dogs fed subsequently with control and green-lipped mussel-enriched diets.

Motor activity (MA) is represented as box plot (median and 25th to 75th percentile) per two consecutive weeks (periods $P_{(i)}$) for $n = 7$ dogs. General linear mixed model for repeated measures: ^a significant difference of Least Squares Means when compared with P1. Significance was reached at P-value lower than 0.003 with Bonferroni's adjustment. As descriptive statistics, MA was presented by age category, and represented as median (25th to 75th percentile) for dogs under 6-y (black circle and short dashed lines) and dogs older than 6-y (black triangle and long dashed line).

Figure 3 - Evolution of a multifactorial questionnaire (MFQ) in osteoarthritic dogs fed subsequentially with control and green-lipped mussel-enriched diets.

MFQ-NRS: MFQ-Numerical Rating Scale, MFQ-S: MFQ-Static, MFQ-D: MFQ-Dynamic, MFQ-RTx: MFQ-Response to Treatment. Data are represented as median, 25th to 75th percentile at day(D)0, D30, and D90. General linear mixed model for repeated measures: (a) was significant difference of Least Squares Means when compared with D0. Multinomial logistic regression for repeated measures: *significant odds ratio (D0 vs D30). Significance was reached at P-value lower than 0.017 with Bonferroni's adjustment.

3.4.18 Figures

Figure 1

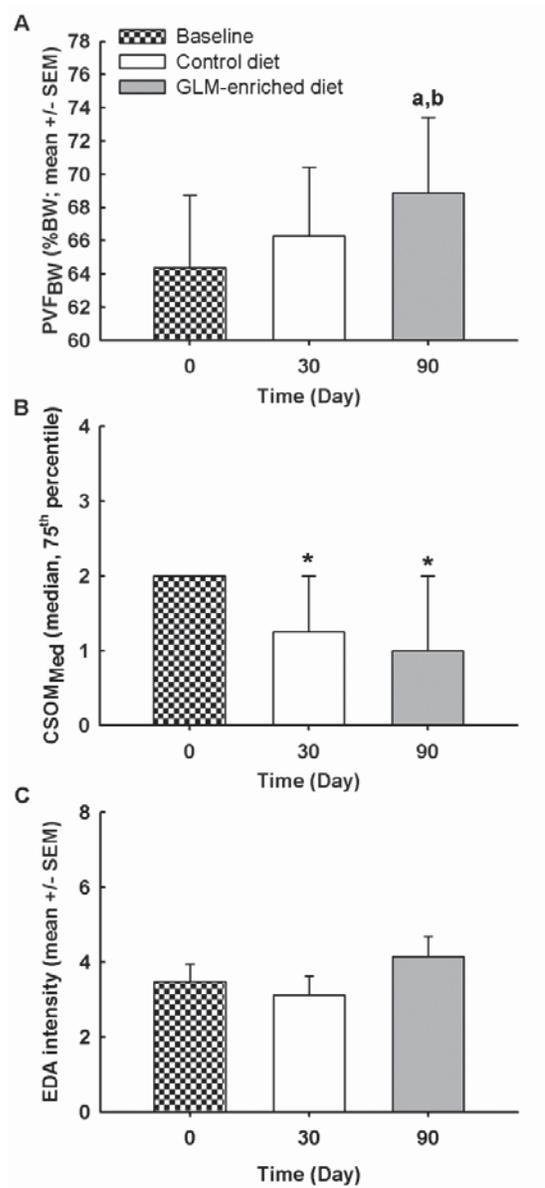


Figure 2

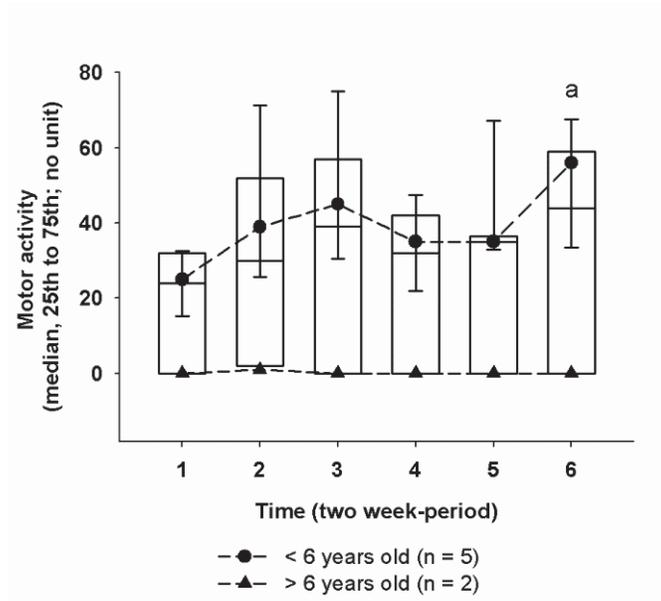
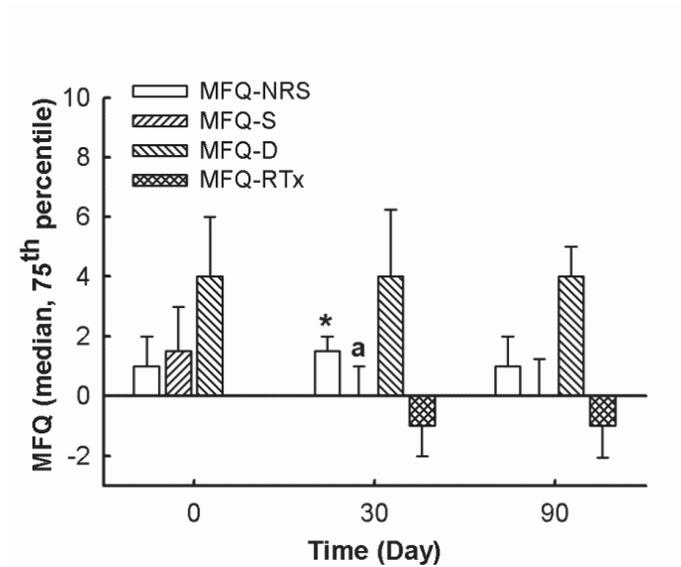


Figure 3



3.4.19 Additional files

Additional file 1 – Annex 1 presenting the static component of the multifactorial questionnaire (MFQ-S) used in the study.

| Annex 1 - Static component of the multi-factorial questionnaire (MFQ-S) | |
|--|--------------------------|
| From the following list, check any depressed or diminished parameter observed on your dog during the last month | |
| | Present |
| Mood | <input type="checkbox"/> |
| Amount of daily activity | <input type="checkbox"/> |
| Willingness to play voluntarily | <input type="checkbox"/> |
| Frequency of postures of a happy dog | <input type="checkbox"/> |
| Appetite | <input type="checkbox"/> |
| Frequency of exercise | <input type="checkbox"/> |
| Sleep (disturbance) | <input type="checkbox"/> |
| From the following list, check any change of attitude | |
| Social relationships (withdrawal) with humans | <input type="checkbox"/> |
| Social relationships (withdrawal) with other dogs | <input type="checkbox"/> |
| Vocalization (audible complaining) | <input type="checkbox"/> |
| <u>Number of total observed parameter : Total score (/ 10)</u> | |

Additional file 2 – Annex 2 presenting the dynamic component of the multifactorial questionnaire (MFQ-D) used in the study.

| Annex 2 – Dynamic component of the multi-factorial questionnaire (MFQ-D) | |
|--|--------------------------|
| From the following list, check any parameter presently observed on your dog | |
| | Present |
| Stiffness/difficulty to rise after rest | <input type="checkbox"/> |
| Stiffness/difficulty moving at the end of the day (after activities) | <input type="checkbox"/> |
| Lameness/difficulty to perform regular activity (walking, running...) | <input type="checkbox"/> |
| Lameness/difficulty to perform brutal activity (jumping, stairs...) | <input type="checkbox"/> |
| Pain when turning suddenly while walking | <input type="checkbox"/> |
| Difficulty to sit or lay down | <input type="checkbox"/> |
| Difficulty to rise from a lying position | <input type="checkbox"/> |
| Difficulties to squat, urinate, or defecate | <input type="checkbox"/> |
| <u>Number of total observed parameter : Total score (/ 8)</u> | |

4 DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Synthèse et résumé des résultats de recherche

L'objectif de la recherche présentée ici est de développer les connaissances relatives à la validité de la mesure de la douleur. Le choix des méthodes de mesure de la douleur s'est appuyé sur une définition générale de la douleur animale (Zimmermann, 1983) : « une expérience sensorielle provoquée par un dommage tissulaire qui induit une réponse réflexe comportementale, une réponse autonome et des comportements d'apprentissage, d'évitement et d'adaptation ». Sur cette définition commune, nous avons utilisé des méthodes de mesure de la douleur similaires pour le bovin et le chien et recueilli les résultats de recherche dans des conditions de douleur différentes pour établir la validation des mesures.

En suivant, le paradigme défini pour la douleur (à savoir, plus de douleur chez les animaux traités avec une analgésie de faible intensité et moins de douleur chez les animaux avec une analgésie de forte intensité ou traités pour la cause de la douleur), la recherche a commencé avec une simple question. Est-ce que dans les conditions de douleur induite (modèles chirurgicaux) ou naturelle (arthrose), les changements observés et mesurés [mesures comportementales (échelles de douleur et mesures objectives), mesures physiologiques (mesure de la réponse sympathique) et dosage de bio-marqueurs associés à la douleur] traduisaient la douleur exprimée chez la vache et le chien ? Clairement, la réponse à cette question est oui. Plus précisément, les résultats de recherche ont démontré la présence de douleur centralisée chez nos deux espèces, le bovin et le chien, à l'aide de tests de sensibilisation et la mesure de bio-marqueurs cérébrospinaux associés à la douleur.

En corolaire, est-ce que ces mesures sont fiables et valides pour évaluer la douleur ? Nos recherches ont démontré que la mesure de la douleur animale est mieux prédite par la mesure comportementale objective, notamment la vidéo-analyse et la plaque de force (pour la douleur orthopédique chez le chien), que les échelles d'intensité de douleur et les mesures physiologiques. Bien que les échelles soient à un stade précoce de leur développement, l'analyse psychométrique démontre que les échelles testées sont peu fiables, peu valides et peu sensibles au traitement. Les paramètres physiologiques standards sont de mauvais marqueurs (peu spécifiques, moyennement sensibles) de la douleur (surtout chronique).

Lorsqu'ils ont été mesurés, les tests de sensibilisation et la mesure de bio-marqueurs cérébrospinaux (études #1 et #3) corroboraient aux changements des comportements de douleur enregistrés par vidéo-analyse. Ces résultats supportaient le lien qui unit les mesures des changements de comportements à la douleur centralisée.

Également, les mesures de l'activité motrice spontanée et la mesure de l'AED semblent sensibles à la présence de douleur (études #1 et #3) et présentent un lien établi avec la douleur centralisée (étude #3). Néanmoins, les mesures ne sont pas uniformes en fonction de la persistance de la douleur (aigüe par opposition à chronique) et de l'origine de la douleur (viscérale, chirurgicale et chronique).

Finalement, le lien entre la sévérité de la boiterie et celle de la douleur semble dépendant de la méthode de mesure de la boiterie. En effet, la boiterie a été mesurée selon deux approches : une mesure des paramètres cinétiques de la marche lorsque le chien a une marche imposée et une évaluation de la boiterie lorsque le chien se déplace spontanément. Ces deux méthodes usuelles d'évaluation de la douleur ne présentent pas la même association vis-

à-vis de la douleur centralisée (étude #3) et ne présentent pas la même sensibilité de réponse au traitement (études #3 et #4). Cela suggère que la mesure de la boiterie comme marqueur de la douleur devrait être interprétée selon que le comportement de marche est évoqué (plaque de force) ou spontané (volonté du chien à se déplacer par lui-même).

De nombreux points restent à éclaircir et posent de nouvelles questions quant à la validation de la mesure de la douleur chez nos espèces cibles. Au cours de la discussion, les raisons des choix des modèles de douleur et les raisons des choix des méthodes de mesure seront justifiées. Ensuite, la validation des méthodes sera présentée. Les découvertes seront interprétées en prenant en compte les résultats de recherche des études de validation des méthodes de douleur chez nos espèces cibles.

4.2 Étude préliminaire de la validation des mesures sur la base d'un modèle de douleur viscérale chez la vache

4.2.1 La justification du modèle de douleur

La première étude de douleur portait sur la validation des mesures de la douleur viscérale chez la vache laitière. Face à une définition large de la douleur et de ses expressions, nous trouvions empiriquement que le choix de l'espèce n'était pas un obstacle à la validation de la mesure de la douleur. Avantagusement, cela permettrait de vérifier notre hypothèse principale, c'est à dire l'étude des différentes expressions de la douleur dans des conditions différentes pour des espèces différentes. Plus spécifiquement, la

mesure de la douleur en espèce bovine était justifiée par le manque d'information sur la douleur chez la vache laitière et par la volonté de sensibiliser les producteurs bovins à la reconnaissance de la douleur en conditions d'élevage dans cette espèce (Walker et al., 2011).

Pour l'espèce bovine, le choix d'un modèle de douleur viscérale s'est basé sur les jugements cliniques des vétérinaires pour lesquels la douleur abdominale est la plus sévère pour les bovins adultes (Huxley and Whay, 2006; Laven et al., 2009). Il n'y avait pas de modèle de douleur viscérale chez la vache au début de l'étude. Sous couvert du contrôle du comité d'éthique d'utilisation des animaux, une étude pilote a permis d'évaluer la reproductibilité et la faisabilité de l'implantation d'une pince sur la paroi du réticulum (pré-estomac de bovin) des vaches suivant une incision du rumen (ruminocentèse). L'implantation de la pince sans perforation de la paroi du réticulum mimait une pathologie fréquente en médecine bovine : la réticulo-péritonite traumatique (RPT). Lorsque cette étude a été réalisée, il n'y avait pas d'étude de la douleur d'origine viscérale chez la vache. Récemment, Mialon *et al.* (2012) ont étudié un modèle chirurgical par ruminocentèse chez les vaches laitières. Les changements comportementaux et les paramètres de stress mesurés sur une période de 2 jours suivant la ruminocentèse permettaient de comparer un groupe contrôle avec un groupe traité avec une anesthésie locale administrée en périphérie de l'incision chirurgicale. Ce modèle ne différenciait pas les groupes entre eux. Également, la mesure de la douleur suivant une chirurgie correctrice de déplacement de caillette (pré-estomac de bovin) n'a pas permis de différencier des vaches ayant une administration de kétoprofène (AINS) des vaches traitées avec un placebo (Newby et al., 2013). Le modèle de douleur par implantation d'une pince (étude #1) se différenciait de celui de la ruminocentèse et du traitement

chirurgical du déplacement de caillette par la persistance de l'influx nociceptif due à la présence du corps étranger (induisant une inflammation chronique par comparaison à la chirurgie) et par le choix d'une analgésie en palier composée d'AINS et de morphiniques (par comparaison à un traitement à base d'anesthésique local peropératoire ou d'AINS seul). Bien que nos travaux soient exploratoires, la comparaison des modèles viscéraux chez la vache adulte suggère la validité du modèle induisant une douleur inflammatoire chronique dont les expressions étaient modulées par différents paliers d'analgésie. À l'inverse, les conditions chirurgicales que sont la ruminocentèse et la chirurgie de déplacement de caillette, ne permettaient pas de distinguer la présence de douleur de l'effet du stress (Mialon et al., 2012; Newby et al., 2013). Cela suggérait implicitement les limites du modèle de douleur viscérale aiguë pour étudier la douleur chez les bovins (Mialon et al., 2012; Newby et al., 2013). Également, la difficulté à mesurer la douleur chez les vaches laitières en douleur viscérale aiguë pourrait être expliquée par l'utilisation de méthodes non valides pour quantifier la douleur bovine, telles que des mesures physiologiques, comme la cortisolémie plasmatique et des mesures de comportement usuellement utilisées pour l'étude de la douleur causée par la castration et l'écornage du veau (Stafford and Mellor, 2005; Stafford, 2007).

4.2.2 La gestion de la douleur et l'analgésie de secours

Le fondement de la mesure de la douleur est de rapporter une information pertinente au sujet de la douleur ressentie par l'animal. Dès lors, un changement observé ne peut véritablement avoir de lien à la douleur que s'il est réellement affecté par la douleur. Le paradigme développé en recherche chez les animaux, et pratiqué comme une méthodologie de

référence, consiste à évaluer la présence ou l'absence du paramètre choisi lorsque la douleur est présente ou absente (Rusbridge et al., 2007; Carsten et al., 2008). Durant notre étude initiale, nous avons donc comparé l'effet de trois conditions analgésiques : l'analgésie faible (groupe 1, n = 4), l'analgésie modérée conduite par l'administration préventive et répétée d'AINS (groupe 2, n = 5) et l'analgésie forte conduite par l'administration préventive et répétée d'AINS et d'opioïdes, incluant une administration épidurale (groupe 3, n = 3). Ces paliers analgésiques se basent sur la combinaison d'analgésiques de différentes classes thérapeutiques (par exemple des opioïdes avec des AINS), de différentes voies d'administration (administration par voie épidurale, systémique) et d'administration préventive et continue de ces analgésiques.

Le paradigme des paliers d'analgésie est à la base même de la validation des méthodes de mesure. Cependant, l'étude #1 démontre que les trois paliers d'analgésie ne sont pas atteints pour l'ensemble des méthodes. C'est le cas des échelles de douleur. Cela pourrait suggérer que le paradigme de mesure de la douleur est faux ou que des méthodes ne sont ni fiables, et ni valides. Les résultats démontrent que l'analgésie multimodale induisait des changements de comportements qui étaient interprétés comme étant des comportements de douleur alors que la mesure de la sensibilité mécanique nociceptive démontrait une absence de sensibilisation centrale. De la même façon, il a été démontré que des veaux castrés présentaient un meilleur appétit et une amélioration du gain de poids suivant l'administration continue d'aspirine alors que des veaux traités avec une combinaison de butorphanol, de kétamine et de xylazine ne présentaient pas un tel gain de poids (Baldrige et al., 2011). La baisse de gain de poids pouvait être due à la douleur non contrôlée ou au fait que les veaux, endormis en raison des effets sédatifs des

traitements, consommaient moins de fourrage (Baldrige et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les analgésiques seraient des facteurs confondants lors de la validation de la mesure de la douleur, notamment lorsque les analgésiques affectent le comportement spontané de l'animal.

D'un point de vue éthique et pour maintenir le bien-être des vaches, un protocole d'analgésie de secours était administré lorsque la douleur dépassait une valeur seuil calculée à l'aide des échelles et l'AED, soit les mesures en direct, sur place. Le décompte du nombre d'analgésie de secours, le délai entre l'induction de la douleur et la première administration d'analgésie de secours étaient considérés comme des informations indirectes de la perception douloureuse. Également, le décompte du nombre d'analgésie de secours est utilisé comme une mesure fiable pour indiquer la réponse au traitement. L'administration d'analgésie de secours n'est que récemment introduite dans les études de douleur en espèce bovine (Baldrige et al., 2011; Schulz et al., 2011). Les études chez les vaches montrent que le choix des méthodes et le choix du seuil d'intervention demeurent subjectifs (Baldrige et al., 2011). Par comparaison à notre étude, le nombre d'analgésies de secours demeure très faible chez des vaches suivant la ruminocentèse (Baldrige et al., 2011). Cela pourrait être expliqué par un modèle chirurgical, la ruminocentèse, qui induit peu de douleur, un seuil de déclenchement de l'analgésie de secours trop élevé et des mesures non sensibles aux traitements. Dans l'étude #1, la moyenne cumulée des administrations d'analgésie de secours du groupe 3 était inférieure à celle du groupe 1, et supérieure à celle du groupe 2. Ces résultats ne correspondaient pas aux hypothèses de départ et pouvaient être expliqués par l'effet de l'analgésie multimodale sur le comportement des vaches. Ces résultats suggèrent également que l'utilisation des méthodes de mesures non validées

pour mettre en place une analgésie de secours a pu introduire un biais dans la validation des méthodes de mesure.

Dans le cas de notre étude, la fréquence d'administration de l'analgésie de secours était très élevée sur la période de 21 jours. En théorie, les vaches ayant eu une analgésie de secours ne seraient plus comparables par rapport aux autres vaches du même groupe. Cependant, le faible échantillonnage et une forte prévalence de l'administration de l'analgésie de secours ne permettaient pas d'exclure ces animaux. De plus, l'analgésie de secours avait un effet sur les mesures. Par conséquent, l'influence de l'analgésie de secours a été utilisée pour expliquer la variabilité de l'erreur résiduelle des modèles statistiques. Cette méthodologie n'a pas été appliquée dans de précédentes études de validation des méthodes de douleur chez la vache et serait à valider au cours de futures études.

4.2.3 La justification du choix des méthodes d'évaluation de la douleur

La baisse de la sensibilité nociceptive est une mesure usuelle utilisée pour indiquer la présence de douleur centralisée. Or, de nombreuses études chez les bovins adultes ne montrent pas de sensibilisation. En effet, des tests de stimulation mécanique appliqués sur des pattes des bovins démontraient que des pattes avec boiterie des bovins boiteux présentaient des sensibilités proches des sensibilités des pattes normales des vaches non boiteuses, alors que les seuils de sensibilité de la patte controlatérale de la vache boiteuse étaient très élevés (Kemp et al., 2008). Finalement, chez des vaches boiteuses, il était démontré une forte variabilité des mesures suivant des tests nociceptifs mécaniques répétés sur un même sujet (Kemp et al., 2008). Chez les bovins

adultes, des études rapportaient l'absence de sensibilité nociceptive d'origine thermique chez des vaches atteintes de mammites aiguës (Rasmussen et al., 2011) alors que la mesure de la sensibilisation thermique était précise et valide (Machado Filho et al., 1998; Herskin et al., 2003a). En se basant sur une mesure de la sensibilisation thermique fiable et valide (Machado Filho et al., 1998; Herskin et al., 2003a), les résultats suggéraient que la sensibilité intrinsèque des vaches pouvait être variable. L'immobilisme de la vache, une sensibilité différente entre deux tests ou entre deux zones cutanées sur lesquelles est appliqué le stimulus nociceptif et un manque de précision de la mesure pourraient expliquer la difficulté à mesurer la sensibilisation. Il est également possible que la relation non linéaire entre l'intensité du stimulus et la réponse de retrait au test nociceptif (Neugebauer and Li, 2002) ne permette pas de détecter avec précision le seuil de sensibilisation. Ces problématiques n'ont pas été abordées dans les études de sensibilisation chez les bovins.

Dès lors, en absence de données sur la précision et les seuils de douleur attendus chez la vache laitière en lactation, l'analyse des mesures de la sensibilisation n'a pas porté sur la valeur absolue de la mesure. De façon originale, la valeur équivalente au seuil de tolérance à la douleur a été empiriquement établie comme étant la médiane de toutes les mesures de sensibilité mécanique obtenues durant la période contrôle. Afin de limiter l'influence de la posture sur la réponse nociceptive (Kemp et al., 2008), la sensibilité a été mesurée sur les quatre pattes. Une patte sensibilisée était une patte qui présentait un seuil de douleur inférieur à la médiane des mesures obtenues en période contrôle. La mesure de la sensibilité nociceptive était dichotomique pour chaque patte (patte sensible ou non sensible) et le statut de sensibilisation de la vache se faisait en décomptant le nombre de pattes sensibles. Une telle approche n'avait pas été investiguée et il n'y avait pas de

données de référence chez la vache. Il est possible que le choix du seuil de référence ne présente pas les meilleures qualités métrologiques de sensibilité et de spécificité. En effet, il est possible que le seuil de référence soit influencé par le stress (Herskin et al., 2004; Rasmussen et al., 2011). Dès lors, pour tester la validité de cette mesure, il serait nécessaire de mesurer conjointement la sensibilisation et les marqueurs de stress, dans le but de comparer les mesures dans une condition de stress par opposition à une condition de douleur.

Les marqueurs neurophysiologiques associés à la douleur sont considérés comme des mesures de référence associées au mécanisme physiopathologique de la douleur. Chez les bovins, les catécholamines ont été mesurées au niveau du liquide cébrospinal pour étudier la douleur en condition clinique. Même si cette mesure n'est pas usuelle, la concentration de noradrénaline cébrospinale est augmentée chez le mouton après une stimulation nociceptive (Eisenach et al., 1996). La concentration d'une protéine de 15 KDa était diminuée au 21^{ème} jour après l'induction de la douleur chez les vaches du groupe 1. La protéine de 15 KDa identifiée sous le nom de transthyrétine (TTR) n'est pas un bio-marqueur usuel de la mesure de la douleur. La diminution significative de la concentration de TTR en présence de douleur (groupe 1) et l'augmentation dans le groupe d'analgésie multimodale (groupe 3) a révélé l'intérêt scientifique d'une telle molécule pour l'étude de la douleur.

L'étude des modulations des bio-marqueurs associés à la douleur dans le liquide céphalorachidien demeure exploratoire chez la vache. Les molécules identifiées (noradrénaline et TTR) avaient des changements de concentrations concomitants à la sensibilisation centralisée. La sous régulation de TTR mesurable 21 jours après l'induction de la douleur

supporte l'usage de la neuroprotéomique pour étudier les changements neurophysiologiques au niveau du système nerveux central lors de douleur chronique. En effet selon cette technique, il a été démontré une augmentation des concentrations de CGRP et de la substance P dans le liquide céphalorachidien chez des rongeurs en douleur neuropathique (Beaudry and Vachon, 2006; Ferland et al., 2011)

La mesure d'un bio-marqueur plasmatique pourrait améliorer l'évaluation de douleur en médecine vétérinaire en général et en médecine bovine, en particulier. Néanmoins, chez les bovins, des bio-marqueurs cérébrospinaux identifiés comme des bio-marqueurs de la douleur ne sont pas systématiquement des bio-marqueurs de la douleur plasmatiques fiables et valides. Pour exemple, si la substance P cérébrospinale est un bio-marqueur de douleur validé dans des modèles de douleur animaux (Afrah et al., 2002; Beaudry and Vachon, 2006), la substance P plasmatique n'était pas un bio-marqueur de la douleur clair chez le veau après la castration (Coetzee et al., 2008). En considérant ces raisons, la protéine TTR n'a pas été mesurée dans le sang.

Le progrès dans la biologie moléculaire et la génomique a profondément modifié la capacité de détecter des changements neurophysiologiques incluant ceux causés par la douleur. Particulièrement, la découverte que beaucoup de neuromédiateurs solubles sont modulés par la douleur (Beaudry et al., 2009), comme la substance P chez le rongeur (Beaudry and Vachon, 2006) ou la nocistatine chez le bovin (Okuda-Ashitaka and Ito, 2000). Cette analyse neuroprotéomique chez le bovin ouvre l'occasion de considérer les nouvelles méthodes d'investigation de la réponse neuronale spécifique de douleur, du moins chez les bovins.

Le comportement des vaches a été mesuré à l'aide de la vidéo-analyse (Krohn and Munksgaard, 1993; Krohn, 1994) et de l'accélérométrie (White et al., 2008; Theurer et al., 2012) sur des modèles de mammite, de boiterie et de chirurgie de convenance sur les veaux. Le choix des comportements et la prédiction sur le niveau d'activité des vaches en douleur viscérale étaient difficiles à anticiper car il n'existait pas de modèle de douleur viscérale qui décrivait les comportements affectés par un tel modèle. Les comportements décrits dans les différentes études de la douleur semblaient trop spécifiques de la cause de douleur. En effet, le changement de fréquence de mouvement de la tête et des oreilles chez le veau écorné, la mobilité et le décompte de temps passé debout chez le veau castré (Schwartzkopf-Genswein et al., 1998; Sylvester et al., 2004; Stafford and Mellor, 2005) sont des comportements qui ne permettent pas de différencier des sévérités de douleur chez la vache suivant une ruminocentèse (Mialon et al., 2012) et lors de chirurgie du déplacement de caillette (Newby et al., 2013). Également, les changements de la fréquence du comportement normal chez le veau, à savoir la fréquence de la position debout ou couchée et l'appétit par exemple, sont peu sensibles à la douleur chez des vaches ayant une coupe de queue (Tom et al., 2002), des vaches ayant une mammite induite (Siivonen et al., 2011) et des vaches ayant de douleur viscérale (Mialon et al., 2012; Newby et al., 2013). Cela suggère qu'il n'y aurait pas de comportement spécifique connu, lequel dépendrait de la cause, pour étudier la douleur chez la vache adulte. Ainsi, pour étudier la douleur au cours de l'étude #1, tous les comportements visibles ont été décrits et décomptés. Un observateur, qui ne connaissait pas l'étude et la randomisation, listait les comportements enregistrés par vidéo-analyse chez les vaches. La liste des comportements identifiés chez les vaches du groupe 1 a servi de base pour établir un profil de douleur, comme précédemment

réalisé chez les souris (Mogil et al., 2010). La liste a été révisée par la comportementaliste pour clarifier les définitions et diminuer le nombre d'interprétations possibles de la mesure. Finalement, un éthogramme précis a été présenté pour l'évaluation de la douleur d'origine viscérale comme il a été précédemment réalisé chez des vaches qui changent d'environnement (Krohn and Munksgaard, 1993; Krohn, 1994).

Il n'y a pas de d'échelle d'intensité de douleur et de grille comportementale de douleur chez la vache laitière. Les échelles de douleur VPS (*Veterinarian Pain Scale*) et TPS (*Technician Pain Scale*) ont été construites pour permettre une évaluation subjective chez la vache adulte. Le développement initial des échelles de douleur s'est basé sur les changements de comportements observables lors de réticulo-péritonite, sur les comportements identifiables par des éleveurs de bovin, ainsi que les comportements identifiés comme des comportements de douleur dans les études de la douleur bovine, à savoir des anomalies de posture (Molony et al., 1995; Grondahl-Nielsen et al., 1999), les réactions des vaches face aux manipulations (Zimmermann, 1983) et des mesures physiologiques usuellement utilisées en clinique. Le processus de développement de la grille n'a pas suivi les règles de validation des échelles. Des analyses par des spécialistes, des enquêtes et des phases de développement des échelles seraient nécessaires pour établir des études de validation des ces instruments.

La baisse des concentrations plasmatiques en cortisol et en catécholamines ont supporté historiquement la mise en place des traitements analgésiques et sédatifs chez les veaux castrés et écornés (Sylvester et al., 1998; Mellor et al., 2002; Sutherland et al., 2002). Aussi, la mesure du cortisol plasmatique et de la réponse autonome avait pour but de vérifier la

validité de ces méthodes à mesurer la douleur chez le bovin adulte dans une condition de douleur viscérale.

4.2.4 La validation de la mesure avec l'étude de douleur vache

L'étude de douleur bovine (étude #1) était une étude exploratoire d'évaluation de la validité des méthodes lors de douleur aiguë et chronique (21 jours) chez la vache laitière. Après l'induction de la douleur et l'administration des traitements analgésiques par palier sur une durée de 3 jours pour obtenir trois conditions algiques, les vaches présentaient des changements neurophysiologiques, comportementaux et physiologiques mesurables sur une période de 21 jours. Nos résultats permettaient de différencier les trois groupes algiques et de vérifier notre hypothèse pour juger de la validité des méthodes utilisées à mesurer la douleur.

L'algésimètre mécanique démontrait une sensibilisation chez les vaches en douleur. De façon concomitante, les vaches du groupe #1 présentaient une diminution des concentrations de TTR et de noradrénaline dans le liquide céphalo-rachidien. Pour la première fois, nous décrivons un mécanisme central de la douleur modulé par l'association d'analgésiques centraux (morphine et butorphanol) et d'AINS (acide tolfénamique) par comparaison à l'administration d'aspirine. La vidéo-analyse et la mesure de l'activité motrice démontraient que les vaches en douleur étaient plus agitées. Les échelles de douleur composite VPS et TPS, le cortisol plasmatique et l'AED ne permettaient pas de mesurer de façon univoque différentes sévérités de douleur.

Les vaches du groupe #1 ayant une simple administration d'aspirine présentaient une sensibilisation centrale mesurable avec un test nociceptif

mécanique alors que les vaches sous analgésie unimodale et multimodale ne présentaient pas de sensibilisation centrale. Toutefois, si cette sensibilisation a été évidente deux semaines après la mise en place de la pince, il est à noter que les vaches du groupe #1 ne présentaient pas de sensibilisation centrale systématiquement mesurable durant les deux premières semaines suivant la mise en place de la pince. Nos résultats suggèreraient que les tests mécaniques, répétés sur l'ensemble des pattes, permettaient d'observer de la sensibilisation uniquement à 21 jours. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur des modèles de douleur aiguë chez le veau. En effet, des veaux présentaient une sensibilité nociceptive mécanique immédiate après un écornage (Gibson et al., 2007). Cette sensibilité nociceptive était corrélée à des modifications des paramètres électro-encéphalographiques indicateurs d'activité nociceptive (Gibson et al., 2007), mais il est également possible que la réponse neuronale mesurée avec un EEG soit associée au stress (Bergamasco et al., 2011). Pris dans son ensemble, les résultats suggèrent que la mesure de la sensibilisation serait confondue avec le stress en période de douleur aiguë. Il est également possible que l'analgésie de secours administrée précocement chez les vaches sous aspirine ait retardée la sensibilisation centrale suivant la mise en place de la pince.

La sensibilisation centrale a été quantifiée durant la période chronique de la douleur ce qui diffère des résultats obtenus sur des modèles de douleur chronique chez la vache. En effet, la mesure de la sensibilisation n'a pas été discriminante de la sévérité de la douleur chez les vaches lors de mammite (Rasmussen et al., 2011) et de boiterie chronique (Whay et al., 1998; Whay et al., 2005; Kemp et al., 2008). Par comparaison aux modèles de douleur chronique, tels que la boiterie et la mammite, il est possible que la méthodologie utilisée dans l'étude #1 augmentait la surface cutanée du test

nociceptif (plusieurs sites de mesure et choix d'un seuil de tolérance au test nociceptif). La méthodologie pourrait avoir amélioré la fiabilité. En effet, la fiabilité est associée à l'erreur de mesure et les raisons des erreurs de mesure identifiées pouvaient être: 1) l'observateur (difficulté à interpréter le comportement de la vache dont le retrait de la patte n'est pas franc suivant la stimulation, être influencé par le résultat du test précédent sur la même patte ou entre les pattes, avoir des délais de mesure qui peuvent être variables entre la réaction de retrait de la patte de la vache et l'arrêt de la stimulation mécanique exercée sur la patte), 2) la vache (anticipation du test, refus de garder l'appareil sur une patte ou un site de mesure, influence de son environnement qui peut diminuer ou augmenter son attention sur la manipulation en cours). Dans l'étude #1, les mesures sur plusieurs pattes (6 mesures par patte par vaches) permettaient de tester la variabilité entre les mesures pour chaque patte comme indicateur d'erreur de mesure. En plus de la fiabilité, la méthodologie pourrait avoir amélioré la sensibilité de la mesure en augmentant la chance de tester des zones de sensibilisation qui peuvent être variables d'un individu à l'autre. Également, il est possible que la douleur infligée par notre modèle de douleur viscérale était plus sévère que la douleur induite par la mammite et la boiterie. Or, la mesure de la sensibilisation lors de douleur abdominale n'avait pas encore été évaluée chez la vache laitière (Mialon et al., 2012; Newby et al., 2013). Cependant, un modèle de dilatation intestinale chez le mouton provoquait une importante sensibilisation nociceptive (Kania et al., 2006; Kania et al., 2009). La sensibilisation d'origine viscérale pourrait s'expliquer par la double afférence nociceptive d'origine vagale et spinale au niveau de l'estomac (Vergnolle, 2010). Pour nous permettre de mieux cerner une double origine de la sensibilisation, il serait intéressant d'étudier en parallèle la sensibilisation et les réponses

électrophysiologiques enregistrées au niveau des voies afférentes viscérales. L'apparente discordance des résultats d'études en fonction de méthodes de mesure et des différentes causes de douleur chez la vache suggèrent que la validation de la sensibilisation chez la vache laitière demeure préliminaire. De nouvelles études devraient être conduites pour établir la fiabilité et la validité de la méthode utilisée dans l'étude de recherche.

La diminution de la concentration cérébrospinale de noradrénaline chez les vaches du groupe #1 (analgésie faible) validait en partie la modulation d'origine centrale de la douleur. Cette diminution de la concentration de noradrénaline a été également observée chez des patients en situation post-traumatique (Cui et al., 2012). Si la diminution de la concentration en noradrénaline cérébrospinale semble concordante avec la sensibilisation centrale chez les vaches du groupe #1, les différentes concentrations en noradrénaline cérébrospinale ne sont pas liées aux différentes sévérités de douleur. D'un point de vue neurophysiologique, la noradrénaline provenant des neurones sympathiques agit au niveau des cellules inflammatoires pour faciliter la relâche de bêta-endorphine (Binder et al., 2004). Également la noradrénaline agit au niveau de récepteurs adrénergiques postsynaptiques, tels que les récepteurs adrénergiques alpha-2 couplés à l'adénylate cyclase et la production d'adénosine monophosphate, qui modulent l'activité neuronale. Ces mécanismes expliquent en partie le rôle antinociceptif de la noradrénaline. Cependant, le mécanisme d'action de la noradrénaline est complexe eu égard de son site d'action (voie supraspinale ou spinale), des systèmes de régulation, de la diversité des récepteurs et de leurs localisations (neurones afférents primaires, neurones de projection au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, inter-neurones et cellules gliales) sur lesquels la noradrénaline agit (Millan, 2002; Pertovaara, 2006).

Dès lors, la relâche de la noradrénaline n'est qu'un des aspects de la modulation centrale de la douleur et ne tient pas compte des autres acteurs et de leurs interactions au niveau central (Millan, 2002). Également, les études montrent une concordance entre la modulation de la noradrénaline et l'augmentation de la cortisolémie plasmatique ce qui supporte l'influence du stress sur les variations de la noradrénaline (Bradesi et al., 2006). Par conséquent, la noradrénaline est sensible et peu spécifique de la douleur chronique chez le bovin adulte.

La douleur induisait une hypercortisolémie pour les trois groupes de traitement, à l'instar de ce qui est observé chez les bovins suivant une chirurgie (Sutherland et al., 2002; Coetzee et al., 2008; Mialon et al., 2012), ou un stress et l'administration d'ACTH (Lay et al., 1996). Chez des veaux castrés et écornés, la cortisolémie est modulée par l'administration d'anesthésiques locaux (Sutherland et al., 2002; Baldrige et al., 2011) mais la cortisolémie n'est pas modifiée chez des veaux non traités par comparaison à des veaux traités avec de l'aspirine (Bergamasco et al., 2011). Des données récentes suggèrent que l'augmentation de la cortisolémie ne reflète pas la sévérité de la douleur chez les veaux castrés (Coetzee et al., 2008; Bergamasco et al., 2011). Chez des vaches adultes, la cortisolémie ne différencie pas les vaches traitées avec une anesthésie locale de celles traitées avec un placebo (Mialon et al., 2012). Face à des résultats inconstants, la mesure du cortisol plasmatique en situation de douleur manquerait de spécificité et de validité pour étudier la douleur aiguë. En revanche, la cortisolémie mesurée à 21 jours de la douleur différenciait transitoirement les vaches du groupe #1 (analgésie faible) des vaches des groupes #2 (analgésie préventive unimodale) et #3 (analgésie préventive multimodale). Si la mesure de la cortisolémie semblait différencier les groupes de traitement, la

cortisolémie était non spécifique car les valeurs de cortisolémie demeuraient proches des valeurs obtenues avant l'induction de la douleur. Dès lors, nos résultats supportent la difficulté à distinguer les valeurs de cortisolémie dues à un stress des véritables valeurs basales de cortisolémie. Ces résultats appuient le manque de validité et la difficulté à interpréter une valeur de cortisolémie pour identifier la douleur chez la vache.

La mesure de l'AED établissait transitoirement différents niveaux de douleur chez les vaches deux semaines après l'induction du modèle de douleur. La mesure de l'AED ne différenciait pas des groupes de veaux écornés et castrés traités avec des analgésiques par comparaison à des veaux traités avec un placebo (Baldrige et al., 2011; Bergamasco et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la mesure de l'AED n'est pas valide ou n'est pas fiable pour mesurer la douleur aigüe. En revanche, l'absence de validité de l'AED n'est pas établie en situation de douleur chronique. Il serait nécessaire de confirmer la fiabilité des mesures de l'AED à l'aide d'autres méthodes qui mesurent avec précision les modulations de l'activité du SNA. Par exemple, la mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque comme marqueur de la chronotropie cardiaque et témoin de l'activité du SNA chez le veau castré (Stewart et al., 2010), pourrait refléter l'activité de l'innervation du SNA. Néanmoins, la validité des mesures de l'activité du SNA devrait être testée par comparaison à des mesures associées aux modulations de l'activité nociceptive telle que la mesure de la sensibilisation.

Les mesures obtenues avec la vidéo-analyse et l'accélérométrie avaient en commun une mesure continue du comportement. La mesure continue de la douleur par la vidéo-analyse a permis d'identifier des comportements spécifiques, chez des vaches ayant une mammite aigüe (Siivonen et al., 2011). L'accélérométrie a permis de quantifier le temps passé

debout (Cyples et al., 2012; Medrano-Galarza et al., 2012). À l'inverse, des évaluations ponctuelles du comportement, telles que le temps passé debout (Newby et al., 2013) et les mouvements de tête et d'oreille (Mialon et al., 2012), ne permettaient pas de différencier des vaches traitées avec un analgésique des vaches traitées avec un placebo. Ces résultats suggèrent qu'un enregistrement vidéo réalisé sur une période de temps prolongée et à l'aide d'une mesure objective est une méthode plus fiable et valide qu'une observation ponctuelle de comportements sélectionnés *a priori*.

Les vaches en douleur viscérale présentaient une diminution de l'activité motrice, mesurée à l'aide de la vidéo-analyse et l'accélérométrie. La vidéo-analyse a démontré que des vaches avec mammite passent moins de temps debout par comparaison à des vaches sans mammite (Siivonen et al., 2011; Cyples et al., 2012; Medrano-Galarza et al., 2012). Également, l'accélérométrie a démontré que des vaches ayant une ruminocentèse avec une incision chirurgicale sur le flanc passaient plus de temps debout que les vaches ayant une incision chirurgicale paramédiane (Newby et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la baisse de l'activité associée à une modification de posture est une mesure sensible du modèle de douleur viscérale. À l'inverse, la mesure de l'activité motrice manque de spécificité par rapport à la vidéo-analyse pour mesurer différentes sévérités de douleur. Cela suggère l'absence de lien clair entre les intensités de l'activité motrice et les comportements enregistrés par vidéo-analyse. Ainsi, pour valider l'évaluation de l'accélérométrie, il serait donc intéressant d'établir la concordance entre la mesure de l'activité motrice et celle des comportements enregistrés par la vidéo-analyse sur le même intervalle de temps (Robért et al., 2011).

Parmi les comportements enregistrés par la vidéo-analyse, la baisse de l'appétit est une mesure sensible du modèle de douleur. L'appétit était

diminué chez les vaches suivant l'induction du modèle de douleur viscérale, ce qui était également observé chez des vaches après une ruminocentèse (Newby et al., 2013). L'appétit était augmenté chez des vaches traitées au kétoprofène par comparaison aux vaches traitées avec un placebo sur une durée de 3 jours après la ruminocentèse (Newby et al., 2013). À l'inverse des veaux castrés ou écornés sous analgésie multimodale avaient moins d'appétit (Baldrige et al., 2011), ce qui n'était pas le cas de l'étude #1 dans les 2 jours suivant la douleur. Ces résultats suggèreraient que la diminution de l'appétit est sensible et spécifique de la douleur viscérale. Toutefois, la baisse de l'appétit peut être considérée comme secondaire aux troubles digestifs induits par le modèle de douleur viscérale.

L'originalité de notre étude est de démontrer, à l'aide de la vidéo-analyse, que la vache en douleur est agitée lorsqu'elle est couchée. Des vaches avec mammite piétinaient plus que des vaches sans mammite (Siivonen et al., 2011; Medrano-Galarza et al., 2012). Des moutons castrés étaient moins agités lorsque la castration se faisait sous anesthésie locale par comparaison à des moutons traités avec un placebo (Molony et al., 2002). Ces études corroboreraient nos résultats. L'agitation serait un critère d'évaluation de la douleur viscérale aiguë et chronique. Chez les vaches avec ruminocentèse, Mialon *et al.* (2012) n'ont pas mesuré la prévalence de l'agitation mais les auteurs ont suggéré que l'agitation serait à étudier lors de chirurgie viscérale. Jusqu'à ce jour, aucune étude de mesure de la douleur viscérale ne rapporte la fiabilité et la validité de la mesure de l'agitation. Par contre, la sensibilité et la spécificité de la mesure de l'agitation soutiennent l'intérêt à étudier l'agitation comme un signe de douleur. Notamment, il faudrait vérifier si ce comportement est également exprimé au cours d'autres conditions douloureuses.

La mesure de la position de la tête par vidéo-analyse semblerait différencier les groupes de traitement en fonction de l'effet des analgésiques administrés. Les vaches du groupe #3 (analgésie multimodale) présentaient moins fréquemment leur tête en position haute. En lien avec une baisse de l'activité motrice, les positions de la tête semblaient indiquer que les vaches du groupe #3 paraissaient « endormies ». De tels effets des analgésiques sur le comportement ont été observés chez des veaux castrés et traités avec de l'aspirine par comparaison à ceux traités avec une combinaison de substances à propriété sédatrice et analgésique (Baldrige et al., 2011). Ces résultats démontreraient que la mesure objective du comportement par vidéo-analyse est discriminante entre l'effet sédatif et l'effet analgésique des morphiniques chez les bovins.

Finalement, les échelles comportementales de douleur ne différenciaient pas uniformément des sévérités de douleur. Même s'il existe des points communs entre les comportements enregistrés par la vidéo-analyse et ceux listés dans l'échelle standardisée de douleur vétérinaire (appétit, posture), l'étude exploratoire suggère que le développement des échelles de douleur bovine n'est pas terminé. De nouvelles échelles de douleur pourraient être développées en listant des comportements identifiés avec la vidéo-analyse, en évaluant les comportements par des experts, et en testant la fiabilité et la validité des échelles selon différentes conditions de douleur chez la vache laitière.

4.2.5 Conclusion sur la validité des méthodes pour la continuité du projet

Cette étude de recherche a permis d'étudier la validation de méthodes usuelles de mesure de la douleur chez les vaches dans un contexte de modèle expérimental de douleur viscérale. Également, l'étude a permis de développer des méthodes non utilisées chez les bovins pour l'étude de la douleur.

Les résultats de l'étude ont permis un tri préliminaire des méthodes la douleur en fonction de leurs capacités à distinguer différentes sévérités de douleur. Parmi les méthodes, la mesure de la sensibilisation centrale et la mesure de bio-marqueurs neurophysiologiques supportent l'établissement d'une douleur pathologique. L'analyse comportementale par vidéo-analyse a permis d'identifier des comportements sensibles et spécifiques pour la mesure de la douleur. La mesure de l'intensité de l'activité motrice avec un accéléromètre semble peu spécifique. La mesure de l'AED pourrait être une méthode applicable à la mesure de la douleur chronique chez les animaux. Au cours de cette étude exploratoire, les échelles de douleur ne différencient pas les différents groupes de traitement de la douleur. Finalement, les données préliminaires sur TTR en tant que possible bio-marqueur sont une réelle découverte.

4.3 La validation des méthodes de mesure lors de douleur orthopédique chez le chien

L'étude de la validation des méthodes chez la vache a permis une classification préliminaire des méthodes en fonction de la capacité à mesurer différentes intensités de la douleur en lien avec l'administration de différents traitements analgésiques (placebo, analgésie unimodale et préventive, analgésie multimodale et préventive). Les études de recherche chez le chien spécifiquement et souffrant de douleur orthopédique, permettront de vérifier la validité de ces méthodes en conditions expérimentales et cliniques.

4.3.1 La justification des modèles de douleur

La justification du choix des modèles de douleur orthopédique est multiple. Tout d'abord, les expressions de la douleur d'origine orthopédique sembleraient différentes des expressions de la douleur viscérale. En effet, chez la vache, la perte d'appétit serait un comportement spécifique du modèle pouvant être dû à la douleur et également causé par les troubles mécaniques suivant l'implantation de la pince sur le pré-estomac des vaches. Par comparaison avec des modèles rongeurs, la perte d'appétit est observée lors de douleur postopératoire viscérale (Hayes and Flecknell, 1999; Shavit et al., 2005) mais la perte d'appétit n'est pas observée lors de douleur orthopédique induite chimiquement ou chirurgicalement (Bove et al., 2006). Ces différences d'expression de la douleur sont marquées lorsque l'on compare les comportements des animaux pour lesquels l'origine et la durée de la douleur différent entre les modèles (Hayes and Flecknell, 1999; Roughan and Flecknell, 2004; Shavit et al., 2005; Bove et al., 2006; Mogil et al., 2010).

Nous avons donc mis à profit cette spécificité des modèles pour évaluer la validité des méthodes à mesurer uniformément la douleur.

D'un point de vue clinique, la douleur orthopédique est fréquente et considérée comme l'une des conditions les plus douloureuses par les propriétaires de chien (Muir et al., 2004) et les vétérinaires (Weber et al., 2012). En corolaire, et ce point est au centre de notre projet de recherche, la douleur orthopédique est souvent assimilée à la sévérité de la boiterie pour un membre porteur. En effet, la douleur orthopédique est un type de douleur aiguë par excès de nociception associé au mouvement. La boiterie et les troubles de la démarche traduiraient les paroxysmes douloureux causés par la mise en charge du membre porteur. La détermination du lien entre la douleur et la boiterie nous permettrait de confirmer la validité de la mesure de la boiterie dans les études de douleur orthopédique.

L'étude chez la vache vache démontrait des qualités métriques variables pour les instruments de mesure testés durant la période postopératoire courte (48 heures postopératoires) et tardive (jusqu'à 21 jours postopératoires). Ces résultats suggéraient des expressions de la douleur différentes en lien avec des mécanismes dynamiques de la douleur (Basbaum et al., 2009). Nous avons donc étudié la douleur orthopédique aiguë d'origine postopératoire et la douleur chronique associée à l'arthrose en utilisant des instruments similaires à ceux utilisés chez la vache. Cette stratégie a permis d'étudier la pertinence de tester ces mesures pour d'autres populations et des contextes différents.

Chez le chien, le modèle standardisé de la douleur aiguë d'origine orthopédique est une synovite induite par l'injection intra-articulaire d'urate de sodium (Schumacher et al., 1974; Hazewinkel et al., 2008). Ce modèle standardisé crée une boiterie reproductible. L'inflammation apparaît dans les

deux heures suivant l'injection d'urate de sodium puis se résout en 24 à 36 heures (Schumacher et al., 1974; Borer et al., 2003). Ce modèle est inflammatoire mais il est réversible et n'induit pas de lésion articulaire. À l'inverse, pour l'étude #2, une chirurgie du genou, la trochléoplastie, a été choisie car la méthode est standardisable et elle induit une lésion articulaire prolongée. La trochléoplastie est une excision d'une partie de la trochlée du genou du chien. Le postulat était l'existence d'une douleur spontanée créée par l'incision chirurgicale des tissus profonds (peau, fascia, cartilage), comme il a été démontré sur les modèles d'incision de la patte chez le rongeur (Xu and Brennan, 2010). L'évaluation de la décharge spontanée nociceptive d'origine articulaire serait à vérifier sur le modèle canin comme il a été réalisé chez le rat.

Les études #3 et #4 ont pour but l'évaluation de la douleur chronique lors d'arthrose induite chirurgicalement (étude #3) et d'arthrose naturelle chez le chien (étude #4). La étude #3 reposait sur un modèle d'arthrose induite par une instabilité articulaire d'origine chirurgicale (Pond and Nuki, 1973; Brandt et al., 1991), la section du ligament croisé crânial (antérieur) du grasset (genou) de chien. Ce modèle a été couramment utilisé dans l'étude des traitements de l'arthrose. Le modèle est standardisé. L'évolution du modèle est progressive. L'instabilité articulaire provoque une effusion articulaire, de la synovite, un œdème de l'os sous chondral (Libicher et al., 2005; D'Anjou et al., 2008) dans les 6 et 8 semaines suivant l'induction du modèle. Les lésions macroscopiques et histologiques traduisent une modification du métabolisme du tissu cartilagineux, une dégradation du tissu cartilagineux et la présence d'inflammation (Lorenz et al., 2005; Goranov, 2007). Les lésions macroscopiques et histologiques du cartilage sont accompagnées d'une diminution de l'appui de la patte opérée et une

diminution de l'activité motrice sur une période de 56 jours (Moreau et al., 2011). Les lésions morphologiques et histologiques significatives d'arthrose apparaissent 4 à 8 semaines après l'induction du modèle (Libicher et al., 2005; Lorenz et al., 2005).

Si l'étude #3 permettait d'évaluer la validité des méthodes de mesure de la douleur dans une condition expérimentale, l'étude #4 permettait de vérifier la validité des méthodes en condition d'arthrose naturelle. Or, toute la problématique d'une telle étude est l'hétérogénéité des symptômes cliniques et de lésions articulaires atteintes par l'arthrose. L'inclusion des chiens arthrosiques dans une étude de la validation de la mesure de la douleur semble un point clé de la validation des méthodes. La sélection des chiens arthrosiques est déterminée selon la confirmation de signes radiologiques d'arthrose (Hielm-Björkman et al., 2011; Walton et al., 2013), en fonction de l'âge (Brown et al., 2007; Brown et al., 2013) et, en plus, selon une diminution des paramètres cinétiques lors de l'appui de la patte au sol (Moreau et al., 2010; Walton et al., 2013). Les critères de sélection définissent différents profils de chiens arthrosiques et probablement différents profils de douleur. Pour Brown *et al.* (2007), seuls les chiens âgés de plus de 8 ans sont inclus. Cette sélection élimine les chiens jeunes ayant une arthrose post-traumatique. Lorsque la sélection s'effectue sur une diminution significative des paramètres cinétiques (Moreau et al., 2010; Walton et al., 2013) comme il a été réalisé au cours de l'étude #4, il est possible que les chiens les plus atteints soient sélectionnés, ce qui pourrait augmenter la sensibilité de la mesure de la douleur. Curieusement, il n'y a pas de consensus sur la sélection des chiens arthrosiques pour la validation des méthodes de mesure de la douleur. Il serait utile de comparer les résultats de

la validation de la mesure en fonction de différents profils cliniques, comme l'âge ou la force d'appui des pattes au sol.

4.3.2 La justification des traitements

Au cours de l'étude de douleur chez la vache, il était observé que le comportement des vaches traitées avec un morphinique était similaire au comportement des vaches en douleur. L'étude #2 démontre que les chiens ayant une administration de morphine et de tramadol diminuent leur activité et expriment des comportements pouvant être interprétés comme des signes de douleur. Également, la morphine et la gabapentine (Shih et al., 2008; Wagner et al., 2010), ayant des propriétés sédatives, diminuent l'activité du chien. Ces résultats supportent que l'activité analgésique induit des comportements qui se confondent aux comportements associés à la douleur.

Afin de ne pas confondre l'effet sédatif des analgésiques sur le comportement de la douleur, les travaux de recherche présentent souvent deux mesures : l'une pour l'analgésie et l'autre pour la sédation, sans véritablement faire un lien entre les deux mesures (DeRossi et al., 2011; Slingsby et al., 2011; Campoy et al., 2012). Pour l'étude #2, la mesure de la sédation n'a pas été réalisée à l'aide d'une échelle de sédation. En revanche, la mesure des fréquences d'apparition des comportements avant et après la chirurgie chez les chiens sous analgésie multimodale (groupe #2) par comparaison à ceux des chiens du groupe contrôle négatif (#1) a permis d'isoler l'effet analgésique de l'effet sédatif des traitements analgésiques. Également, l'étude des comportements par vidéo-analyse a démontré que le changement de comportement associé à l'administration de butorphanol pouvait être différencié du changement de comportement causé par de la douleur chez les chiennes ovario-hystérectomisées (Kyles et al., 1998; Fox et

al., 2000). L'effet sédatif des analgésiques sur le comportement est connu. L'originalité de ces observations est de supporter que la vidéo-analyse aurait une importance à discriminer les comportements affectés par la sédation de ceux liés à la douleur (Fox et al., 2000).

Selon les observations de l'étude #1 et les résultats de l'étude #2, l'effet sédatif des analgésiques limitait l'interprétation des résultats et la validité des mesures. Face à cette difficulté, les analgésiques n'ont pas été utilisés pour les études #3 et #4. Les chiens ont été traités avec des substances non analgésiques ayant un potentiel thérapeutique pour diminuer les signes d'arthrose et n'ayant pas d'effet connu sur le comportement. L'étude de recherche postulait une relation linéaire entre la progression de la maladie et la perception de la douleur.

Pour l'étude #3, les chiens avaient une administration sous-cutanée de tiludronate. Le tiludronate est un biphosphonate dont l'activité principale est de limiter la résorption de l'os en diminuant l'activité ostéoclasique. Ce mécanisme s'opère en inhibant les pompes à proton ATP-asiqne des ostéoclastes riches en ions divalents ce qui favorise l'apoptose des ostéoclastes (David et al., 1996). Également, le tiludronate diminuerait la production d'oxyde nitrique et la relâche de cytokines pro-inflammatoire (Monkkonen et al., 1998). L'administration de tiludronate, dans le cas du modèle chirurgical d'arthrose, diminuait la quantité de liquide synovial associée à la synovite post-chirurgicale, diminuait les concentrations en prostaglandine E₂ et en oxyde nitrique dans le liquide synovial et modulait le mécanisme de dégradation du cartilage (diminution de MMP-13 et ADAMTS-5) et de l'os sous chondral (cathepsine K) (Moreau et al., 2011). Ces changements suggéraient que le tiludronate diminuait l'inflammation locale, et de ce fait, aidait à diminuer la douleur.

Pour l'étude #4, les chiens étaient alimentés avec une diète enrichie en moule verte. Ce produit naturel marin se compose de chondroïtine sulfate, de glucosamine et surtout d'acides gras essentiels tels que l'acide eicosapentanoïque (EPA) et l'acide docosahexanoïque (DHA). L'association de la chondroïtine sulfate et la glucosamine aurait des activités chondroprotectrices (Sanderson et al., 2009). Les acides gras EPA et DHA sont des médiateurs lipidiques métabolisés par des lipoxgénases dont les métabolites ont des propriétés anti-inflammatoires (Serhan, 2005). Un tel traitement augmentait de façon significative les concentrations sériques de EPA et DHA des chiens (Rialland et al., 2012), ce qui démontrait l'assimilation de la diète enrichie et supportait le potentiel thérapeutique de la moule verte.

Le consensus retenu par le Collège Américain de Rhumatologie est de traiter l'arthrose à l'aide d'anti-inflammatoire (AINS et acétaminophène) ou de tramadol. Les autres traitements pharmacologiques (morphine, duloxétine, corticoïdes, par exemple) sont des traitements possibles pour les cas de patients non répondants aux traitements usuels (Hochberg et al., 2012). Chez le chien, les traitements pharmacologiques reconnus pour l'arthrose sont majoritairement des anti-inflammatoires et des coxibs. Ces traitements sont utilisés pour valider des instruments de mesure de la douleur chronique chez le chien (Brown et al., 2008; Brown et al., 2010a; Hielm-Björkman et al., 2011). Notre approche était très différente puisque nous avons établi les qualités métriques des mesures sur la base de substance ayant un effet thérapeutique attendu faible. L'avantage d'une telle approche était d'observer la capacité des méthodes à mesurer des changements faibles. Le risque était d'invalider des méthodes si l'effet thérapeutique était trop faible ou

inexistant. Il serait donc nécessaire de confirmer la validité des mesures sur la base de traitement reconnu, tels que les anti-inflammatoires et des coxibs.

4.3.3 Les qualités métrologiques des méthodes de mesure

En comparant les résultats des trois études, le programme de recherche a permis de trier les méthodes en se basant sur la capacité des méthodes à discriminer différentes intensités de douleur. Nous allons successivement présenter les qualités métrologiques des méthodes testées et comment la validation de ces méthodes s'intègre dans les connaissances actuelles en mesure de la douleur.

4.3.3.1 Synthèse de résultats de recherche

Les échelles standardisées, l'échelle 4A-VET modifiée (étude #2) et la SVAPS (étude #3), satisfaisaient à des critères de fiabilité mais ne permettaient pas de différencier les groupes de traitement entre eux. Une échelle propre à chaque chien, CSOM, serait plus spécifique et d'interprétation plus facile par les propriétaires de chien. De l'ensemble des méthodes, la vidéo-analyse (études #2 et #3) et le PFV (études #3 et #4) étaient fiables et valides et révélaient différentes sévérités de douleur. Les mesures de l'AED (étude #2 et #3) et l'activité motrice (étude #4) révélaient différentes intensités de douleur mais la validité des méthodes n'était pas uniforme entre les études de recherche. Ce manque d'uniformité suggère que les méthodes (l'AED et l'activité motrice) ne sont pas adaptées à la mesure de la douleur ou que l'hypothèse d'un changement des paramètres physiologiques n'est pas valide pour les conditions de l'étude et pour les populations testées.

4.3.3.2 La validité des échelles de mesure de la douleur

Théoriquement, l'échelle d'intensité de douleur est l'instrument de référence de la douleur. Les stratégies de validation permettent de tester la validité de construit de l'échelle au cours de son développement et lors de son utilisation pour des populations données dans des conditions spécifiques (American Educational Research Association, 1999). La validation de convergence basée sur des calculs de corrélation entre les mesures, ainsi que la validation discriminante (comme par exemple, la comparaison entre différents groupes de traitement) sont des stratégies de validation en médecine vétérinaire. Le programme de recherche a suivi ces grandes lignes développées en psychométrie pour valider les échelles de douleur (Streiner and Norman, 2003).

Les échelles de douleur testées sont des échelles comportementales (4A-VET modifiée, SVAPS, STAPS et MFQ), une échelle visuelle analogue (EVA) et une échelle de type PRO (*Patient-Reported-Outcome*) nommée CSOM. La construction des échelles utilisées était différente entre les échelles. L'étude de la validation des échelles composites était de nature exploratoire. L'échelle 4A-VET est développée à l'aide d'un panel d'experts (Laboissière B., 2006) mais l'échelle 4A-VET, utilisée dans l'étude #2, était un forme modifiée de l'échelle originale (Laboissière B., 2006). La forme modifiée a été écrite par les investigateurs de l'étude sur la base de l'expérience acquise au cours de l'étude pilote, de l'hypothèse formulée par Laboissière et al., (2006) sur le manque de validité des paramètres physiologiques qui constitue de l'échelle 4A-VET initiale. Les échelles SVAPS, STAPS et MFQ, développées pour les études #3 et 4, étaient composées d'items provenant d'échelles de douleur validées chez le chien arthrosique (Wiseman et al., 2001; Hielm-Björkman et al., 2003). Les

échelles SVAPS, STAPS et MFQ avaient une validité de face, caractéristique qui n'est pas reconnue comme une validité et qui n'existe plus dans la nomenclature en psychométrie. L'unidimensionnalité des échelles composites, la fiabilité et les validités des scores des échelles d'intensité de douleur SVAPS, STAPS et MFQ ont été successivement testées pour étudier la validation de l'utilisation des échelles d'intensité de douleur. Ces études demeurent à un stade exploratoire dans le cadre du développement des échelles. Cependant, par comparaison aux résultats des échelles validées en médecine vétérinaire, l'analyse des résultats des études exploratoires permet d'identifier plusieurs points importants dans le processus de construction et de validation des échelles vétérinaires.

L'échelle 4A-VET modifiée (étude #2) et la SVAPS (étude #3) présentaient les résultats satisfaisants de consistance interne. Seule 4A-VET modifiée présentait des qualités métrologiques satisfaisantes en différenciant les groupes de traitement chez les chiens immédiatement après la chirurgie. Ces résultats corroboraient avec les travaux de validation de 4A-VET démontrant que des chiens traités avec de la morphine avaient moins de douleur que ceux traités avec un placebo en période postopératoire (Laboissière B., 2006). À l'inverse, SVAPS, qui présentait une validité de face (Wiseman et al., 2001; Hielm-Björkman et al., 2003), ne différenciait pas les groupes de chiens arthrosiques traités au tiludronate de ceux traités avec un placebo. Il est donc évident que des étapes supplémentaires de sélection des items, de développement des échelles et de validation du contenu sont nécessaires pour s'assurer que la fiabilité et la validité soient de nouveau évaluées au cours d'études futures. Ces observations supportent la nécessité de passer par des étapes successives de développement des échelles et de leur validation continue (Cronbach and Meehl, 1955).

Pour l'étude #3, la fiabilité des scores d'EVA entre les deux évaluateurs (fidélité inter juge) était satisfaisante. À l'inverse, la mesure de douleur par quatre observateurs avec une EDS ne montrait ni de corrélation (corrélation de Spearman), ni d'accord (test Kappa) entre les scores des échelles (Holton et al., 1998b). Également pour l'étude #3, les scores de douleur obtenus avec une EVA étaient cohérents avec ceux d'une échelle numérique simplifiée. Par contradiction, la mesure de la douleur de chiens arthrosiques réalisée par un même observateur avec deux instruments différents, une ENS et l'échelle validée d'arthrose HCPI, ne montrait pas de corrélation entre les deux échelles (Hielm-Björkman et al., 2011). Ces résultats supportent que l'analyse de la fiabilité est une condition nécessaire pour étudier la validité des instruments mais cette analyse ne préjuge pas de la cohérence de l'observateur (fiabilité intra-observateur) et de la stabilité de la mesure (test-retest) qui n'ont pas été testés. En effet, les sources d'erreur de la mesure ne sont pas connues avec ces échelles.

Si les scores de douleur étaient cohérents dans l'étude #3, l'étude des relations entre les scores de douleur et les mesures objectives a permis d'établir un lien entre le score de douleur et les troubles comportementaux associés à la douleur. Pour la première fois, la corrélation entre les scores d'EVA et les mesures objectives a démontré que deux évaluateurs ne mesuraient pas le même aspect de la douleur. En effet, pour l'étude #3, alors que les scores d'EVA étaient influencés pour un évaluateur par la boiterie (mesurée avec PFV), pour le second observateur, les scores d'EVA étaient associés à la sensibilisation centralisée. Ces résultats corroborent la manque de validité concurrente entre les scores d'échelle de douleur et les paramètres cinétiques chez des chiens avec une boiterie aiguë ou chronique (Waxman et

al., 2008; Hielm-Björkman et al., 2011). Ces résultats supportent que les évaluateurs interprètent et perçoivent différemment la douleur exprimée.

Le coefficient alpha de Cronbach a été calculé afin de tester l'homogénéité des items et de traduire l'unidimensionnalité des échelles 4A-VET modifiée, SVAPS, STAPS et MFQ (études #2 et #3). À l'instar des coefficients alpha de Cronbach obtenus pour des échelles d'intensité de douleur, HCBPI, 4A-VET, CBPI et LOAD, développées et validées chez le chien (Hielm-Björkman et al., 2003; Laboissière, 2006; Brown et al., 2007; Hercock et al., 2009), les coefficients alpha de Cronbach des échelles 4A-VET modifiée et STAPS avaient une valeur supérieure à 0,7 établi comme un seuil de décision pour définir l'unidimensionnalité. Ces résultats supposent que les échelles sont comparables or les échelles n'ont ni la même composition ni la même longueur de test (Hielm-Björkman et al., 2003; Laboissière, 2006; Brown et al., 2007; Hercock et al., 2009). Selon la formule de calcul du coefficient alpha de Cronbach, l'estimé du coefficient alpha de Cronbach augmente avec le nombre d'items qui composent l'échelle, augmente avec la faible variance des items qui composent l'échelle et suppose une inter-relation entre les items ou la mesure d'une seule dimension (Cronbach and Shavelson, 2004). Également, toute autre facteur étant constant, l'estimé du coefficient alpha de Cronbach est meilleur lorsque la distribution est normale plutôt qu'une distribution asymétrique des données. S'il est facile de comparer les échelles sur le nombre d'items qui la compose, l'interprétation de la valeur du coefficient alpha de Cronbach doit se faire au moins en tenant compte de la longueur du test et de la corrélation entre les items qui compose l'échelle. Pour exemple, l'échelle de douleur GCMPS considérée fiable et valide (Morton et al., 2005) est construite en quatre parties et chaque partie est composée de 5 à 9 questions. Le seuil de décision

du coefficient alpha de Cronbach fut fixé à 0,6 lors du développement de l'échelle GCMPS pour chaque partie composant GCMPS. Selon les standards, les valeurs attendues du coefficient alpha de Cronbach sont comprises entre 0,75 et 0,90 (Streiner and Norman, 2008). Pour GCMPS, il est possible que la valeur seuil de 0,6 était choisie en raison du faible nombre d'items qui composent chacune des parties de l'échelle alors que les quatre parties de l'échelle GCMPS pouvaient mesurer différentes dimensions dans l'échelle. Finalement, le point commun entre les études est que le coefficient alpha de Cronbach est interprété comme une caractéristique du test plutôt qu'un estimé de la corrélation entre items pour une population donnée et dans une condition donnée au moment de la mesure. Ainsi, le coefficient alpha de Cronbach n'indique pas la consistance du test à différent temps, qui serait mieux évalué par un test-retest, ni même l'accord du test dans ces différentes formes. Nous voyons que l'interprétation du coefficient alpha est difficile sans avoir certaines informations complémentaires à celle de l'estimé du coefficient alpha de Cronbach. Cela suggère que l'estimé du coefficient alpha de Cronbach semble un mauvais critère de comparaison de l'homogénéité des échelles les unes par rapport aux autres.

Le calcul du coefficient alpha de Cronbach est une méthode fréquemment utilisée en médecine vétérinaire. Pour évaluer la consistance interne et tester l'unidimensionnalité des échelles, des méthodes basées sur l'analyse factorielle sont également utilisées. Ces méthodes d'analyse mathématique permettent de décrire la variabilité entre des variables mesurées et permettent de dégager des facteurs communs aux variables mesurées qui correspondent à des énoncés corrélés entre eux et représentant une dimension. Lors de son développement, l'analyse factorielle de l'échelle de CBPI, mesurée chez 70 chiens arthrosiques et chez 50 chiens sans

arthrose, démontrait que les items se regroupaient en deux facteurs : la sévérité de la douleur et l'interférence de la douleur (Brown et al., 2007). Récemment, une analyse factorielle réalisée sur les scores de CBPI sur une population dénombrant 222 chiens arthrosiques, démontrait que l'ensemble des items formait une seule dimension (Walton et al., 2013). Ces résultats démontrent que l'étude de la validité du construit latent ne semble pas reproductible d'une étude à une autre pour une même échelle. Surtout, les deux études qui ont analysé la validité de construit de CBPI (Brown et al., 2007; Walton et al., 2013) suggèrent que l'analyse factorielle ne précise pas quel facteur est le vrai et quelles variables qui composent les facteurs sont les vraies mesures de la douleur. Ces résultats pourraient remettre en question la validité interne de CBPI. Également, ces résultats suggèrent un développement incomplet pour l'échelle CBPI dont la mesure est considérée valide pour une population donnée et dans un contexte donné (par ses auteurs) (Brown et al., 2007; Brown et al., 2008).

La composition des échelles de douleur est donc au centre de la problématique. Premièrement, l'étude #2 montrait que l'échelle de douleur 4A-VET, surtout 4A-VET*beh*, était sensible à l'effet sédatif des analgésiques. Au lieu de 4A-VET, nous aurions pu utiliser l'échelle GCMPS (Holton et al., 2001), dont les qualités psychométriques de fiabilité et de validité sont établies. Or, des travaux récents ont montré que les scores de GCMPS étaient également sensibles à l'effet sédatif des drogues analgésiques (Shih et al., 2008; Guillot et al., 2011). Ainsi, malgré leur développement psychométrique satisfaisant, la validité et l'utilité des échelles GCMPS et 4A-VET seraient incertaines pour évaluer la douleur postopératoire lorsque les signes de la douleur sont confondus avec ceux de la sédation. Du moins, pour la 4A-VET, sa composante comportementale interactive, 4A-VET*beh*, y est sensible, et

une étude ultérieure comparative de 4A-VET modifiée et réduite et GCMPS a indiqué que cette dernière surcotait les animaux endormis, en comparaison de la 4A-VET (Guillot et al., 2011). Deuxièmement, l'étude des associations entre la vidéo-analyse et les scores de 4-AVET modifiée montre que des items qui composent l'échelle ne sont pas sensibles et spécifiques à la douleur. Par contre, 4A-VET_{leg}, une des deux sous échelles de 4-AVET modifiée, était corrélée au comportement spontané de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' qui était mesuré à l'aide de la vidéo-analyse. Le changement de la fréquence d'apparition de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' était fiable, sensible et prédictif de la douleur orthopédique. Ces résultats appuyaient la validité de 4A-VET_{leg}. Il se trouve que 4A-VET_{leg} se compose d'items qui graduent la 'boiterie', la 'réponse douloureuse à une palpation de la zone chirurgicale' et 'l'intensité de la réponse douloureuse à une palpation'. Pour l'échelle 4A-VET, l'item correspondant à 'réponse douloureuse à une palpation de la zone chirurgicale' était le plus prédictif du traitement par électro-acupuncture chez quinze chiens atteints de douleur thoracolombaire sévère (Laim et al., 2009). Également, l'item nommé 'palpation et la mobilisation de la patte arthrosique' était sensible au robenacoxib et au carprofène chez des chiens arthrosiques (Edamura et al., 2012). Pour l'échelle UMPS, les items correspondants à 'la palpation de la zone chirurgicale' et le 'mouvement' étaient prédictifs de l'activité analgésique des opioïdes et du kétoprofène dans une étude réalisée sur 426 chiennes suivant une ovario-hystérectomie (Wagner et al., 2008). Finalement, les échelles non reconnues pour lesquelles la fiabilité et la validité des mesures n'ont pas été testées (Vasseur et al., 1995; Sammarco et al., 1996; Pibarot et al., 1997), sont composées d'items incluant une mesure de la douleur liée à la 'manipulation des membres douloureux' et le 'mouvement

de l'animal'. Ces échelles différencient des chiens arthrosiques et des chiens en douleur postopératoire, traités avec des AINS (Vasseur et al., 1995) et des opioïdes (Sammarco et al., 1996; Conzemius et al., 1997) par comparaison à des chiens traités avec un placebo. Ces résultats suggèreraient qu'un nombre restreint d'items qui composent les échelles présentent des mesures sensibles et spécifiques de la douleur. À l'inverse, la diversité des items qui composent les échelles pourrait diminuer la sensibilité et la spécificité des mesures des échelles. Troisièmement, la validation de convergence d'échelles de douleur chronique a démontré une corrélation entre les scores des échelles nommées CBPI, LOAD et HCPI chez des chiens arthrosiques traités avec des AINS (Walton et al., 2013). Cela suggèrerait des réponses au traitement anti-inflammatoire semblable entre les trois échelles. En corolaire, la validité de construit a été étudiée avec une analyse factorielle pour chacune des échelles CBPI, LOAD (Walton et al., 2013) et HCPI (Brown et al., 2007; Walton et al., 2013). Les paramètres d'analyse factorielle démontrent que les items, dont le score est le plus corrélé au score total de leur propre échelle, sont différents d'une échelle à l'autre et non conservés entre deux études de validation de construit (Brown et al., 2007; Walton et al., 2013). De ces observations, on peut supposer que les échelles développées à ce jour en médecine vétérinaire semblent répondre à un même construit mais la définition du construit ne semble pas suffisamment précise. Cela favorise l'émergence d'échelles composées de nombreux items qui eux-mêmes ne présentent ni le même poids ni la même précision de mesure. On voit également clairement que l'inclusion de nombreux items, même s'ils sont homogènes dans une échelle, n'est pas une garantie pour augmenter la sensibilité des échelles de douleur. Ces observations sur les échelles de douleur, conjuguées aux résultats obtenus avec la vidéo-analyse (un seul

critère sensible et spécifique) suggéraient que l'inclusion d'items non spécifiques à la douleur dans des échelles composites pourrait diminuer la précision, la validité et introduire des biais de mesure. Au contraire, la sélection d'un ou de deux critères spécifiques serait suffisante pour obtenir une échelle de douleur simple et valide. Ces hypothèses seraient à valider en comparant des scores d'échelles composées d'items les plus valides et le plus prédictifs, aux scores d'échelles actuelles dont la validité a été démontrée.

L'échelle CSOM ne suivait pas le cheminement classique de la validation des échelles de mesure car le contenu de CSOM était différent entre chaque évaluateur et non comparable entre notre étude (étude #4) et les études ayant eu recours au CSOM (Gingerich and Strobel, 2003; Lascelles et al., 2007). En dépit de ces différences, les échelles CSOM chez le chien arthrosique ont supporté l'efficacité de l'amantadine après l'administration d'AINS (Lascelles et al., 2008) et l'efficacité de dérivés de protéine de lait ayant des propriétés anti-inflammatoires (Gingerich and Strobel, 2003). L'originalité de notre étude était de démontrer qu'une diminution de scores de CSOM était associée à une augmentation des valeurs de PFV (étude #4). L'augmentation de PFV traduisait la diminution de la douleur arthrosique et corroborait les études d'efficacité des AINS et des nutraceutiques (Moreau et al., 2003; Hielm-Björkman et al., 2009b; Moreau et al., 2011). Si le CSOM semble répondre à l'effet des acides gras essentiels EPA et DHA, il serait important de vérifier la corrélation des scores de CSOM avec des mesures de la douleur d'origine centrale (test de sensibilisation) et le comportement spontané validé et spécifique de la douleur, telle que 'la marche avec plein appui de la patte opérée'.

Malgré ces résultats encourageants, CSOM n'échappe pas aux critiques formulées à l'encontre des échelles de type PRO (Hrisos et al.,

2009). Tout d'abord nous ne pouvons comparer nos résultats avec ceux de Lascelles *et al.* (2007) et de Gingerich *et al.* (2003). Il est possible que des erreurs, des omissions ou de mauvaises interprétations aient été introduites dans les comportements listés (Rialland *et al.*, 2012). Dès lors, il est difficile de savoir si les symptômes non reportés dans CSOM sont réellement asymptomatiques ou simplement des oublis. Également, les mesures de CSOM présentaient des valeurs plafonnées. Cela suggérait que des chiens ayant des douleurs de faible intensité ou de forte intensité ne seraient pas adéquatement évalués. Finalement, cette étude était réalisée dans un seul centre ce qui limite toute inférence. Malgré tout, l'étude de la douleur par CSOM pourrait ouvrir de nouvelles perspectives. En effet, à l'aide du CSOM, l'étude #4 a permis de dresser une liste de comportements reconnus comme des signes de douleur par les propriétaires de chiens. Ces comportements étaient regroupés en catégories de comportement ('mobilité réduite', 'mobilité réduite après exercice', 'difficulté à changer de posture', 'difficulté à changer de posture après un temps de repos', et 'résistance aux manipulations'). Les scores de deux de ces catégories, la 'mobilité réduite après exercice' et la 'difficulté à changer de posture après un temps de repos', diminuaient significativement chez des chiens arthrosiques qui consommaient la diète enrichie en moule verte, par comparaison aux scores obtenus chez ces chiens sur diète contrôle. De façon intéressante, une analyse factorielle réalisée sur les scores de l'échelle LOAD chez des chiens arthrosiques démontrent que le 'niveau d'activité durant l'exercice' et 'la raideur après exercice puis repos' sont deux facteurs indicateurs de sévérité de douleur causée par l'arthrose (Walton *et al.*, 2013). Cette étude suggère que la 'mobilité réduite après exercice' et la 'difficulté à changer de posture après un temps de repos' sont des indicateurs de douleur dont la fiabilité et la validité

seraient à étudier au cours d'une étude multicentrique sur une population de chiens arthrosiques.

Même si la validation des échelles était exploratoire, les résultats des études de recherche conjugués à l'analyse des échelles de douleur chez le chien (Tableaux 1 et 2) suggèreraient que les échelles de douleur usuelles chez le chien devraient être simplifiées en conservant uniquement les items les plus fiables et valides. Lors de douleur orthopédique, la palpation de la zone douloureuse et les troubles de la locomotion semblent prédictifs de la présence de douleur. Ces critères sont souvent évoqués parmi les échelles de douleur dites non validées selon la classification de Cohen (Cohen et al., 2008). Cela expliquerait pourquoi les scores de douleur des échelles non validées diminuaient suivant un traitement analgésique et anti-inflammatoire (Vasseur et al., 1995; Sammarco et al., 1996; Pibarot et al., 1997).

Finalement, cette simplification de la mesure pourrait également avoir une finalité pratique. En effet, malgré de nombreux efforts réalisés depuis les 20 dernières années pour développer, entre autres, des échelles de douleur postopératoire fiables et valides, une enquête épidémiologique récente a démontré que les vétérinaires continuent à mesurer la douleur sur la base de critères cliniques individuels (l'attitude, la vocalisation, et les paramètres cardiaques et physiologiques) et seulement 20% des vétérinaires utilisent une échelle de douleur (Weber et al., 2012). Cette enquête suggère une difficulté à uniformiser l'emploi des échelles de douleur en clinique et à mesurer la douleur à l'aide des échelles actuelles. Il est donc fondamental que le travail de développement et de validation soit supporté à l'avenir par des études qui valident l'utilité et la faisabilité de tels instruments en clinique.

4.3.3.3 La vidéo-analyse : une méthode de référence possible pour l'étude de la douleur

Il n'existe pas de consensus pour étudier objectivement la douleur sur la base de changements comportementaux chez l'animal. Les tentatives de mesure de la douleur sur la base d'idées préconçues des changements d'apparence d'un animal en douleur (Morton and Griffiths, 1985) n'ont pas permis de mesurer la douleur avec fiabilité et validité. Le choix des comportements et la classification de ces comportements selon leur capacité à mesurer la sévérité de douleur (Morton et al., 2005) n'étaient probablement pas clairement définis et non spécifiques pour indiquer une sévérité de douleur. Nos résultats d'étude confirment que les animaux présentent des changements spécifiques à l'espèce ce qui est à la base de la mesure de la douleur. Surtout, la mesure des changements des comportements à l'aide de la vidéo-analyse chez le chien (Fox et al., 2000) et les bovins (Siivonen et al., 2011; Fogsgaard et al., 2012) montre que la vidéo-analyse permet une connaissance détaillée des comportements normaux par comparaison aux comportements de douleur.

La vidéo-analyse a permis d'identifier des comportements dont la description est simple, la prévalence est élevée et dont la mesure répond aux effets analgésiques des opioïdes (tramadol, morphine, ropivacaïne et fentanyl) (étude #2) et à l'effet thérapeutique du tiludronate pour le traitement de l'arthrose (Moreau et al., 2011). La vidéo-analyse permettait de tester la fiabilité intra et inter-observateur sur la base d'un même enregistrement. La vidéo-analyse a permis de faire un tri des comportements présentant les meilleures qualités métrologiques de fiabilité et de validité pour l'étude de la douleur (études #2 et #3). La capacité de la vidéo-analyse à identifier des comportements dont la mesure est fiable et valide pour l'étude de la douleur

est cohérente avec les résultats d'étude de la douleur obtenus chez les chiennes ovario-hystérectomisées (Fox et al., 2000) et chez les rongeurs (Roughan and Flecknell, 2004; Mogil et al., 2010; Leach et al., 2012). La possibilité de révéler les expressions comportementales de la douleur de façon spécifique qui ne pourrait être vu et vérifié en observation directe est un avantage de la vidéo-analyse.

Décrite pour la première fois sur des modèles orthopédiques canins, la vidéo-analyse identifiait le comportement spontané de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' comme une mesure fiable et valide. La fréquence de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' diminuait en présence de douleur postopératoire (étude #2) et lors de douleur associée à l'arthrose chirurgicalement induite (étude #3). Surtout, aucun autre comportement ne différenciait aussi bien les groupes de traitement des études #2 et #3. La fréquence de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' augmentait chez les chiens traités avec des analgésiques lors de douleur postopératoire et augmentait chez les chiens traités avec du tiludronate lors d'arthrose chirurgicalement induite. Dès lors, la mesure de 'la marche avec plein appui de la patte opérée' sur une période minimale d'une heure, serait une mesure fiable et valide pour l'étude de la douleur orthopédique chez le chien en conditions expérimentales. Ce comportement n'était pas rapporté dans les études de douleur chez des chiennes ovario-hystérectomisées (Kyles et al., 1998; Fox et al., 2000). La vidéo-analyse a été utilisée chez le rongeurs pour identifier des changements de posture, des modifications de l'activité et du comportement (Roughan and Flecknell, 2004; Mogil et al., 2010) et l'apparition de mimiques faciales (Langford et al., 2010) sur des modèles nociceptifs, chirurgicaux et neuropathiques. Ces changements de comportement semblent uniques à chaque modèle de douleur. Ces résultats

suggèrent que des études robustes de validation soient réalisées pour identifier les changements de comportement spécifiques à un modèle de douleur.

La vidéo-analyse permettait de décrire des comportements spontanés. Seuls des comportements locomoteurs et de changements de posture différenciaient les groupes de traitement entre eux pour les études #2 et #3. Il est possible que la mesure du comportement spontané par description des mouvements et des activités ne soit pas adaptée pour établir les composantes émotionnelles et cognitives décrites en douleur. Pour cela, il aurait été intéressant d'élargir nos mesures de la douleur en évaluant les comportements adaptatifs des animaux associés à un conditionnement, comme il l'a déjà été réalisé chez le rat (Pedersen and Blackburn-Munro, 2006; Boyce-Rustay et al., 2010). En effet, à l'aide des tests de conditionnement, la composante émotive se différenciait de la composante nociceptive de la douleur lorsqu'il y a une administration d'opioïdes (Rutten et al., 2011). Ces tests pourraient identifier des comportements qui ne sont apparemment pas sensibles lors de la mesure des comportements spontanés non conditionnés.

La vidéo-analyse a permis de mesurer le comportement spontané sans interaction avec l'évaluateur. Si l'interaction avec l'évaluateur est une composante de certaines échelles de douleur (Laboissière, 2006), des études de mesure de la douleur par vidéo-analyse chez le rongeur n'ont pas permis de différencier des rats en douleur de ceux sous analgésie en raison d'une adaptation comportementale du rongeur lorsqu'il est en présence de l'observateur (Roughan and Flecknell, 2004). Cela suggérerait que le comportement de défense ou de peur ne permet pas de mesurer la douleur avec fiabilité et validité. La vidéo-analyse a permis de dresser une liste de comportements détaillés pour l'étude de la douleur chez le chien et la vache

en l'absence d'interaction. Cette analyse est une première étape pour dresser une liste de comportements sensibles et spécifiques de la douleur. Toutefois, à ce stade de développement, l'influence de l'observateur sur les changements de comportements associés à la douleur serait à analyser si l'on souhaitait tester la faisabilité et l'utilité de la mesure de ces comportements en condition de pratique durant laquelle l'humain (observateur) interagit forcément avec l'animal.

Une des difficultés de la mesure du comportement est reliée aux conditions expérimentales ou cliniques pour lesquelles les animaux sont sous l'effet sédatif et neuroleptique des drogues anesthésiques (Guillot et al., 2011) et sous l'effet sédatif des morphiniques par exemple (Fox et al., 2000). Nos résultats de recherche confirment clairement des changements de comportements ainsi que des modifications des fréquences d'apparition de comportement en lien avec l'effet sédatif des morphiniques. La fréquence de la "marche avec plein appui de la patte opérée" diminuait suivant l'administration de morphine et de tramadol, ce qui suggérait que l'effet sédatif des morphiniques ne permettait pas de conclure sur la présence ou l'absence de douleur. Or la validité du comportement de la "marche avec plein appui de la patte opérée" est confirmée chez les chiens ayant une arthrose induite chirurgicalement. En effet, la fréquence du comportement augmente lors d'administration de tiludronate (Moreau et al., 2011). Ainsi, la vidéo-analyse permet d'identifier des mesures sensibles aux traitements analgésiques et aux traitements conservateurs comme le tiludronate.

Les comportements étaient mesurés en continu durant une heure (étude #2), comme il a été réalisé chez le rat (Mogil et al., 2010), et en continu durant deux heures (étude #3) par jour d'évaluation. Il est possible qu'une fenêtre d'observation d'une durée plus courte et répétée au cours du

temps permette de quantifier significativement des groupes de traitements, comme cela a été réalisé chez le rat suivant une laparotomie (Roughan and Flecknell, 2004) et lors de l'étude chez les vaches (étude #1). Les périodes et les durées d'observation des changements des comportements sont donc variables. Cette différence entre les études suggère que la fiabilité et la validité de la vidéo-analyse dépendent d'une période significative d'observation des comportements. Dès lors, la fiabilité et la validité seraient à déterminer en comparant des études dont la durée d'observation varie.

Les avantages de la vidéo-analyse par comparaison à l'observation directe ont été identifiés dans la recension de littérature (Tableau VII). Les avantages de la vidéo-analyse dépendent d'une formation adéquate des observateurs qui permettent de suivre la fiabilité du codage (Haidet et al., 2009). Dans ce programme de recherche, chaque codeur a suivi une procédure de formation et d'apprentissage pour le codage. Néanmoins, la stratégie n'a pas été de développer une formation continue des codeurs pour éviter des biais de mesure à l'origine de désaccord sur des évaluations répétées. Seules les fiabilités inter-observateur ont systématiquement été testées pour vérifier l'accord entre les évaluateurs. Également, la fiabilité intra-observateur (fidélité intra-juge) a permis d'évaluer la cohérence de la mesure. Le programme de formation pour l'évaluation du comportement proposé par Haidet et al., (2009) suggère pourtant de tester régulièrement la fiabilité intra-observateur et d'assurer des sessions périodiques de formation. Vu les avantages de la vidéo-analyse, il semble nécessaire que l'apprentissage et la formation continue fassent partie des projets d'étude et pourraient être évalués et présentés selon une courbe d'apprentissage, par exemple, comme preuve de la fiabilité de la mesure.

Ces résultats supportent avant tout que la vidéo-analyse est une méthode objective, discriminante dont la validité et la fiabilité de la mesure peuvent être facilement étudiées par comparaison à des échelles de douleur. Néanmoins, de nouvelles études seraient nécessaires pour établir des recommandations claires pour utiliser la vidéo-analyse et pour étudier des comportements spontanés et évoqués dans différentes conditions expérimentales et cliniques.

4.3.3.4 L'activité motrice : une mesure possible du confort

Le modèle canin de CCLT induit une baisse significative de l'activité motrice (Moreau et al., 2011), ce qui suggère que la mesure de l'activité motrice enregistrée à l'aide d'un accéléromètre est une mesure fiable et valide de l'arthrose post-traumatique. Les chiens atteints d'arthrose naturelle et alimentés avec une diète enrichie en moule verte présentaient une augmentation progressive de l'activité motrice (étude #4). Également, l'activité motrice augmentait suivant un traitement journalier d'AINS sur une période de quinze jours chez le chien arthrosique (Brown et al., 2010a; Wernham et al., 2011). Une amélioration progressive et continue de l'activité motrice était également observée chez des chiens ayant une administration orale quotidienne d'extrait de plante *Brachystemma calycinum* D. Don (Moreau et al., 2012) qui a des propriétés anti-inflammatoires et qui diminue le catabolisme des chondrocytes associé à l'évolution de l'arthrose (Boileau et al., 2010). Chez le chat, l'activité motrice nocturne est augmentée lorsque les chats sont traités au méloxicam (Guillot et al., 2013). Pris dans leur ensemble, la baisse d'activité motrice indiquerait de la douleur chez le chat et le chien arthrosiques (Lascelles et al., 2007; Brown et al., 2010a; Guillot et al., 2013) et cette activité est améliorée suivant un traitement anti-

inflammatoire. De façon intéressante, dans l'étude #4, le lien établi entre le CSOM et l'activité motrice renforcerait la validité de l'activité motrice à mesurer la douleur et le confort. Ces résultats supportent la sensibilité et l'utilité de la mesure de l'activité motrice spontanée à l'aide d'un accéléromètre chez le chien arthrosique (Dow et al., 2009; Brown et al., 2010b).

En comparaison des chiens ayant une arthrose naturelle, l'intérêt à mesurer l'activité motrice lors de douleur aiguë ou post-traumatique semble moins évident. L'étude #3 ne permet pas de distinguer le groupe placebo du groupe tiludronate. Des données préliminaires de l'étude #2 ne permettaient pas de différencier les trois groupes analgésiques (données non montrées). Également, la mesure de l'activité motrice sensible à l'effet sédatif des analgésiques (Guillot et al., 2011), différenciait difficilement la douleur chez des chiens subissant différentes méthodes de ponction de la moelle. Pris dans son ensemble, l'activité motrice semble une méthode d'évaluation plus sensible et de ce fait adaptée à la mesure de la douleur chronique et du confort.

Si la baisse d'activité motrice est une mesure sensible du confort pour le chien ayant une douleur chronique telle que l'arthrose (Lascelles et al., 2007; Brown et al., 2010a), les résultats chez le chien s'opposeraient aux résultats observés chez les vaches. Si les vaches en douleur étaient moins actives, les vaches non traitées avec des analgésiques avait une augmentation sensible de l'activité expliquée par de l'agitation, par comparaison aux vaches sous analgésie (étude #1). La mesure serait précise pour quantifier les changements d'activité mais l'interprétation des changements de l'activité motrice pour l'étude de la douleur n'est pas si claire lorsque les espèces et le modèle de douleur diffèrent. En effet, les animaux ont leur propre cycle

d'activité. Une mesure par accélérométrie chez vingt-cinq bœufs sur une période de 20 jours montre une cyclicité de l'activité mais il existe une variabilité journalière lorsque le bovin passe d'une position debout et une position couchée (Robért et al., 2011). Des études sur des chiens actifs et non actifs permettent de relier la sédentarité à des valeurs basses d'activité motrice. En revanche, lorsque les valeurs d'activité motrice sont élevées, il est difficile d'associer un comportement (par exemple la marche, le trot ou la course) à la valeur de l'intensité motrice chez le chien (Yamada and Tokuriki, 2000; Michel and Brown, 2011). Ces résultats suggèrent que la baisse d'activité semble une mesure pertinente de la douleur mais l'intensité de l'activité motrice ne peut être reliée à une sévérité de douleur ou à un comportement spécifique. Les résultats de recherche suggèrent qu'une étape préliminaire de validation de la mesure de l'activité motrice doit être réalisée pour établir le lien entre les changements de comportements visibles et l'activité motrice.

4.3.3.5 L'étude cinétique

Les forces de réaction au sol sont mesurées avec des plaques de forces ou des tapis de mesure de pression. Ces méthodes sont généralement considérées des méthodes de référence pour quantifier la boiterie (Vasseur et al., 1995; Budsberg, 2001; Waxman et al., 2008). En effet, l'inflammation aigüe ampute sévèrement le PVF (O'Connor et al., 1999; Trumble et al., 2004). Chez les chiens ayant un CCLT, la section de ligament stabilisateur induit une anomalie mécanique de la démarche, notamment sur les mouvements de rotation et de translation (Tashman et al., 2004). Il en résulte que les forces de charge anormales de l'articulation facilitent entre autre l'apparition de l'arthrose équivalent à l'arthrose post traumatique chez

l'homme (Tashman et al., 2004; Brandt et al., 2009). Cette baisse de PVF est observable 4 ans après l'induction chirurgicale d'arthrose (Budsberg, 2001).

Si l'évaluation cinématique et cinétique mesure de nombreux forces, le PVF est une force pour laquelle l'erreur de mesure est minimale et le changement minimum détectable est connu chez le chien arthrosique (Moreau et al., 2013). La mesure est considérée précise et répond aux traitements anti-inflammatoires (Rialland et al., 2013). Les études de recherche démontraient que le PVF augmentait chez les chiens traités avec du tiludronate (Moreau et al., 2011) et une alimentation enrichie moule verte (étude #4). Si PVF répond au traitement anti-inflammatoire, la disparité des réponses entre des traitements anti-inflammatoires et des traitements plutôt analgésiques (Boileau et al., 2005; Malek et al., 2012) suggère que la nature même de l'origine de la douleur, inflammatoire ou neurogénique par exemple, a une influence sur la perception de la douleur et de ce fait, influence le succès du traitement lors d'arthrose.

Le lien physiopathologique de la douleur au changement biomécanique de la démarche est une question qui reste entière et nos études de recherche ont partiellement investigué ces voies. Néanmoins, les points d'avancée sont majeurs. En effet, PVF est associé au changement de comportement, surtout locomoteur, lorsqu'il est évalué objectivement à l'aide de la vidéo-analyse (étude #3) ou subjective (étude #4). Également, il existe un lien entre la sensibilisation centrale et la baisse de PVF chez les chiens dans les 8 semaines suivant l'induction de CCLT (étude #3). De plus, PVF est une mesure classiquement utilisée pour évaluer le changement biomécanique de la démarche. Or, Moreau *et al.* ont démontré au cours d'une comparaison prospective entre l'arthrose naturelle à celle induite chirurgicalement chez le chien, l'existence d'un lien entre le changement structurel, observable par

imagerie médicale et le changement biomécanique chez le chien arthrosique (Moreau et al., 2013). Ces résultats corroborent de récentes observations suggérant que PFV pouvait être utilisé comme une valeur de référence pour valider les mesures de la boiterie et de la douleur lors d'arthrose canine (Brown et al., 2013; Walton et al., 2013). Finalement, le PVF d'une articulation arthrosique est plus affecté lors de surcharge pondérale (Marshall et al., 2010; Moreau et al., 2010), une caractéristique connue chez le patient humain souffrant à la fois d'arthrose et d'excès de poids.

Pris dans son ensemble, PVF semble une valeur de référence pour l'inflammation. Également, PVF serait au centre de la mesure de la douleur lors d'arthrose car PVF établit individuellement un lien clair à la fois avec le changement structurel, les modifications biomécaniques, les changements d'activité locomotrice et de posture et la sensibilisation chez le chien arthrosique ainsi qu'un lien clair avec les facteurs aggravants de la maladie. La mesure de PVF semble une valeur de référence pour l'arthrose chez le chien.

4.3.3.6 La mesure de l'AED n'est pas spécifique de la douleur

Les mesures de l'AED différenciaient ponctuellement les groupes de traitement analgésiques suivant la chirurgie (étude #2) et lorsque le groupe de chiens traités avec un placebo était comparé au groupe de chiens traités avec du tiludronate (étude #3). À l'inverse, les mesures de l'AED ne différenciaient pas les groupes de traitement et le groupe de chiens traités avec une diète enrichie à la moule verte (étude #4) ni les groupes de vaches (étude #1).

Dans l'étude #2, il est possible que la différence de la mesure de l'AED observée dans les premières heures suivant la chirurgie entre les

groupes sous analgésie préventive et le groupe de contrôle, était soit une mesure indirecte de l'activité sympathique, soit influencée par l'effet cardiovasculaire des opioïdes combiné à l'effet neuroleptique de l'anesthésie générale. Au cours de l'étude #3, la mesure de l'AED ne différenciait les groupes de traitement qu'à la quatrième semaine après induction de l'arthrose et initiation du traitement. L'inflammation articulaire est dominante à la quatrième semaine après la chirurgie par comparaison à la 8^{ème} semaine pour laquelle l'inflammation est plus faible. L'AED ne différenciait pas les groupes de traitement à la 8^{ème} semaine. Ces résultats suggèreraient que l'AED mesure la douleur aigüe ou lors d'inflammation. En revanche, la mesure de l'AED ne différenciait pas des rats ayant une douleur chirurgicale (laparotomie et craniotomie) par comparaison à des rats qui n'ont pas subi de chirurgie (Richardson et al., 2007). Ces résultats ne corroboraient pas la validité de l'AED. Néanmoins, il n'y a pas eu d'étude robuste de fiabilité et de validité de l'AED chez l'animal.

En médecine humaine, l'AED a été considérée comme une mesure valide pour évaluer la douleur causée par une chirurgie chez l'enfant (Storm, 2008; Hullett et al., 2009) mais la mesure de l'AED est variable (Chapman et al., 2001; Loggia et al., 2011). Les résultats obtenus chez le chien et la vache démontraient également que la mesure de l'AED était fortement variable. Cette variabilité pourrait être causée par le manque de précision de la mesure ou par l'influence de facteurs confondants sur la mesure. Chez les bovins, la mesure de l'AED est plus élevée chez le veau âgé de plus de six mois que chez le veau âgé de moins de six mois (Dockweiler et al., 2013) ce qui suggère que l'âge (et peut être le tonus sympathique attendant) modifie la mesure de l'AED. Chez les rats, le stress provoqué par l'immobilisation du rongeur augmentait la réponse de l'AED (Süer et al., 1992). L'AED serait

une mesure de stress. Également, des tests opérants ont démontré que le stress augmentait la douleur nociceptive (Vierck et al., 2010) mais à l'inverse, une sensibilité nociceptive n'était pas forcément accompagnée de modifications comportementales associées au stress (Baastrup et al., 2010; Wu et al., 2010). Ces observations suggèrent un lien peu clair entre le stress et la douleur, ce qui expliquerait (du moins en partie) la variabilité de l'AED.

L'étude #4 révélait une variabilité intra-individuelle significative lorsque la mesure était réalisée sur 3 différents temps durant une période de 90 jours. Cette variabilité n'a pas été observée avec PVF et CSOM sur la même période de mesure. Chez le patient humain éveillé, la variabilité intra-individuelle est décrite comme étant dépendante de l'état émotionnel (Patterson et al., 2002) et de la douleur du patient (Storm, 2008; Choo et al., 2010). Cela suggère que la mesure de l'AED ne peut être mesure fiable en absence d'un contrôle de facteur autre que la douleur. En effet, outre le stress et la douleur, chez l'enfant la nausée, les vomissements ou l'attention, par exemple, sont des facteurs qui influencent la réponse de l'AED (Choo et al., 2010). Ces facteurs qui pourraient influencer la mesure de l'AED n'ont pas été étudiées chez le chien au cours de nos études de recherche. Néanmoins, le déplacement du chien en milieu hospitalier comme source évidente de stress, l'hétérogénéité des manifestations cliniques de la maladie au cours du temps pourraient également expliquer la variabilité de la mesure.

Fait important, les résultats démontraient pour la première fois, un lien entre l'AED et la sensibilisation centralisée (étude #3). En d'autre terme, la différence d'activité sympathique, mesurée avec l'AED, entre le groupe tiludronate et le groupe témoin serait expliquée en partie par la sensibilisation centralisée. Ces résultats valideraient un lien direct entre l'AED et la douleur centralisée uniquement lors de douleur intense. Néanmoins, cette relation de

la douleur à l'AED n'a été clairement établie que lorsque les mesures des tests de sensibilisation étaient incluses comme une variable prédictive de la douleur. Ce résultat supporte encore une fois que la mesure de l'AED semble sensible à de nombreux facteurs non associés à la douleur et à la douleur. De nouvelles investigations qui porteraient à identifier et contrôler de tels facteurs pourraient améliorer la validation de cette mesure pour la douleur.

4.3.3.7 La mesure de la sensibilisation : une mesure de référence de la douleur

De l'ensemble des études chez le chien, la sensibilisation a été évaluée au cours de l'étude #3. La sensibilisation était mesurée à l'aide de tests sensoriels quantitatifs (QST). Les mesures des seuils de retrait suivant une stimulation électrique sur le genou et la queue reflétaient, respectivement, l'influence des mécanismes nociceptifs périphériques et centraux à l'origine de la perception de la douleur. Des neuropeptides spinaux spécifiques (substance P et TTR) quantifiés à J56 étaient des marqueurs neurophysiologiques de la sensibilisation centrale.

Une diminution des seuils de la sensibilité électrique au niveau du genou et au niveau de la queue était mesurable à 28 et 56 jours respectivement suivant l'induction de l'instabilité articulaire. Le lien entre l'évolution de la lésion articulaire et la sensibilisation n'a pas été étudié, néanmoins le modèle est très bien décrit et permet de comprendre ou de faire des hypothèses sur la sensibilisation observée chez les chiens. En effet, le modèle de Pond Nuki induit une inflammation qui atteint son paroxysme dans les 4 semaines suivant l'induction chirurgicale d'arthrose. L'œdème de l'os sous-chondral important à 6 semaines est suivi d'érosion et dégénérescence du cartilage observable entre 4 et 8 semaines. L'ostéophytose est observée

tardivement après la chirurgie. (Libicher et al., 2005; Lorenz et al., 2005; D'Anjou et al., 2008). Les tests de sensibilisation électrique appuient l'existence d'une douleur centralisée dans le modèle d'arthrose canin (modèle de Pond Nuki) sur une période de 8 semaines en lien avec la présence d'inflammation articulaire.

Les chiens traités avec un placebo présentaient une sensibilisation au niveau de la queue importante au jour 56, alors que la sensibilisation centrale n'était significativement pas différente de la sensibilisation centrale mesurée en période contrôle chez les chiens traités au tiludronate. Également, la sensibilisation était concomitante à l'augmentation de la concentration spinale en substance P dans le groupe contrôle par comparaison au groupe tiludronate, 56 jours après la chirurgie. La substance P est un marqueur significatif de la douleur d'origine centrale lors d'arthrose (Schaible et al., 2009). Ces résultats supportent que le tiludronate (Bertaim et al., 2013), tout comme le zolédrone, un agent biphosphonate qui diminue la résorption de l'os (Yu et al., 2013), conduisent à une diminution du processus de sensibilisation nociceptive centrale sur un modèle rongeur d'arthrose induite chimiquement. De plus, pour le zolédrone, une diminution de la sensibilité nociceptive se traduit par une diminution significative de la concentration en CGRP au niveau du ganglion dorsal de la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que la diminution de l'activité des astrocytes et des cellules gliales, deux acteurs importants de la sensibilisation dans ce modèle rongeur d'arthrose (Orita et al., 2011; Sagar et al., 2011). Les résultats de l'étude #3 suggèrent que la présence de l'hyperalgésie des chiens arthrosiques serait corrélée à une dégradation progressive de l'articulation dont la progression est modulée par le traitement au tiludronate.

Les résultats de l'étude #3 supportent la présence de la sensibilisation centrale chez le chien ayant une arthrose post-traumatique, de la même façon qu'il a été démontré de l'hyperalgésie et l'allodynie mécanique sur des modèles rongeurs d'arthrose (Fernihough et al., 2004; Bove et al., 2006). Également, ces résultats corroboraient la sensibilisation au froid et l'allodynie mécanique (mesurée avec un appareil de type von Frey), quantifiées chez quinze chiens ayant une rupture des ligaments croisés par comparaison à des chiens n'ayant pas cette pathologie (Brydges et al., 2012). Finalement, les études humaines utilisant des tests de sensibilisation quantitative démontrent que l'arthrose est associée à la douleur centralisée (Gwilym et al., 2009; Arendt-Nielsen et al., 2010; Woolf, 2011). Cette douleur se manifeste par de l'hyperalgésie et de l'allodynie à la fois locale et distante des lésions d'arthrose (Kosek and Ordeberg, 2000b; Bajaj et al., 2001; Arendt-Nielsen et al., 2010). Ainsi, il a été démontré, chez le patient atteint d'arthrose du genou, que l'inflammation au niveau de l'articulation augmente la sensibilisation et la décharge des nocicepteurs périphériques, à l'origine de sensibilisation centrale (Arendt-Nielsen et al., 2010). Les résultats de l'étude #3 confirmeraient l'apparition de la sensibilisation, périphérique induite par l'inflammation au niveau du genou et sa composante centrale, sur le modèle de Pond Nuki chez le chien.

Chez le patient humain arthrosique, la présence d'hyperalgésie est associée à une plus grande intensité de douleur et une faible qualité de vie (Imamura et al., 2008). L'hyperalgésie est communément associée à l'arthrose chez des patients humains en comparaison des patients humains n'ayant pas d'arthrose, néanmoins, l'hypoalgésie et des seuils de sensibilisation similaires entre des patients sans arthrose et des patients arthrosiques ont également été observés chez des patients humains (Kosek

and Ordeberg, 2000a; Gwilym et al., 2009). À l'instar des observations faites en médecine humaine, les résultats de l'étude #3 suggèreraient que la mesure de la sensibilisation électrique est une mesure sensible de la neuroplasticité nociceptive chez le chien ayant une arthrose post-traumatique. Il n'est pas certain que l'étude #3 ait permis d'observer de l'hypoalgésie ou une absence de réaction de réflexe car il n'existe pas de valeur de référence sur cette mesure chez le chien. Dès lors, l'interprétation des résultats de QST devrait être confirmée chez des chiens ayant une arthrose naturelle.

Des mesures localisées et distantes de la lésion articulaire semblent d'intérêt pour étudier la douleur centralisée chez le chien. L'étude #3 évaluait la douleur au niveau de la queue, ce qui n'a pas été présenté à ce jour. Chez le chien, le choix des sites de mesure demeure exploratoire. Une mesure réalisée sur la face dorsale du métacarpe de la patte (Briley et al., 2013; Moore et al., 2013) semble prévaloir en médecine vétérinaire. La reproductibilité de la mesure avec un algésimètre de pression et de von Frey montre que les mesures seraient répétables. Néanmoins, la mesure de la sensibilité nociceptive réalisée au niveau du métacarpe de la patte avec un appareil de von Frey chez des chiens arthrosiques montre également que ces derniers ont des sensibilisations semblables à celles des chiens neurologiquement normaux alors que les chiens qui ont des lésions neuronales au niveau de la corne dorsale présentent une importante sensibilisation (Moore et al., 2013). En humaine, les évaluations cartographiques de la sensibilisation du genou arthrosique chez l'homme permettent de mieux apprécier la neuroplasticité neuronale liée à l'arthrose (Arendt-Nielsen et al., 2010), mais les seuils de sensibilisation semblent également différents en fonction du site de la mesure. Point intéressant, l'étude #3 confirme l'intérêt à mesurer la sensibilisation non seulement au niveau du site touché par l'arthrose mais aussi en périphérie

et en zone éloignée, voire en une zone très distante du site douloureux pour évaluer cette plasticité neuronale (Thompson et al., 2010). Cela suggère que si le principe de la mesure de la sensibilisation gagne à être étudié et validé chez le chien, le choix des sites de mesure devrait être investigué à l'avenir pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la mesure.

Depuis le début du programme de recherche, des méthodes de stimulations nociceptives mécaniques, électro-myographiques et l'EEG ont été testées sur le chien. Notamment, les mesures électro-encéphalographiques combinées à des tests de stimulations nociceptives (Bergadano et al., 2009a) et des techniques de mesures de la sensibilisation seraient fiables, sensibles aux analgésiques et valides chez le chien (Dixon et al., 2010; Kongara et al., 2011; Brydges et al., 2012). Il serait nécessaire que la douleur soit étudiée à l'aide de différentes mesures combinées (tests de sensibilité nociceptive, EEG, imagerie fonctionnelle, par exemple) afin de confirmer nos avancées en validation de la mesure de la sensibilisation chez le chien en douleur.

4.3.3.8 La transthyrétine d'origine spinale serait un marqueur de la douleur

La diminution de la concentration de TTR dans le liquide cébrospinal était une découverte de notre programme de recherche chez les vaches en douleur (étude #1). La diminution de la concentration de TTR mesurée dans l'homogénat de moelle épinière chez le chien du groupe contrôle par comparaison aux chiens traités avec du tiludronate (étude #3) confirme les observations faites chez la vache. Dans les deux cas, la diminution de la concentration de TTR au niveau spinal est observée chez les sujets en douleur en absence d'analgésie. Ces diminutions de concentrations de TTR étaient concomitantes à une sensibilisation centralisée dans l'étude

#3. Ces résultats suggèrent que la mesure de TTR d'origine est un marqueur associé à la douleur centralisée.

La TTR est une molécule homotétramère de 55kDa, riche en tryptophane est synthétisée principalement dans les cellules épithéliales du foie et du plexus choroïde, sécrétés dans le plasma et le CSF, respectivement. Initialement, la TTR est identifiée comme un transporteur des hormones thyroïdiennes et du rétinol. D'une demie vie courte de 2 jours, la TTR plasmatique est éliminée par voie hépatique et rénale. Dans la littérature, le taux plasmatique de TTR est considéré comme un marqueur de pronostic de survie, de la dénutrition chronique (Ingenbleek et al., 1972; Ogunshina and Hussain, 1980), de l'infection et de l'inflammation (Borish et al., 1992; Bourguignat et al., 1996).

Il est décrit dans la littérature qu'une variation post-inflammatoire de TTR est expliquée en partie à l'action transcriptionnelle de cytokines, comme Il-6 (Heinrich et al., 2010), qui réoriente la synthèse hépatique de nombreuses protéines (Bartalena et al., 1992) comme TTR. Également, une sous expression de TTR favoriserait le maintien de Il1- β car TTR est un inhibiteur constitutif de l'Il1- β un acteur pro-inflammatoire (Borish et al., 1992). Ces mécanismes supportent la diminution de la TTR plasmatique lors d'inflammation.

Dans les études #1 et #3, l'hypothèse que la TTR de haut poids moléculaire ne passait pas la barrière hémato-méningée permettait de distinguer la TTR cérébrospinale de celle d'origine plasmatique. Les études #1 et #3 supportent que lors d'inflammation et de douleur, la TTR cérébrospinale diminue. De façon intéressante, il est démontré que TTR diminuait chez des rats ayant une lésion de la corde dorsale de la moelle épinière (Afjehi-Sadat et al., 2010). Également, il a aussi été démontré que la

concentration cérébro-spinale de TTR chez des souris génétiquement modifiées, par comparaison aux souris de type sauvage, augmente la concentration en neuropeptide Y au niveau de l'hippocampe et le ganglion de racine dorsal du nerf sciatique. Cette augmentation est également associée à une augmentation en substance P (Nunes et al., 2006). Ces neuropeptides sont, en outre, impliqués dans la transmission et la modulation de la douleur. Nos résultats suggèreraient que TTR contenu dans le liquide céphalorachidien répond à l'inflammation et la douleur neuronale.

Nos résultats suggèreraient que TTR répond aux traitements anti-inflammatoires. En effet, dans l'étude #1, l'analgésie de secours était positivement associée à la relâche de TTR, alors que pour l'étude #3, TTR était augmentée avec le tiludronate ayant des propriétés anti-inflammatoires. Il a été également démontré que le taux de TTR plasmatique augmentait suivant l'administration de substances ayant des propriétés anti-inflammatoires telles les huiles de poisson riches en acides gras polyinsaturés (Puskás et al., 2003). La TTR semblerait être un marqueur potentiel de la douleur chronique lors d'inflammation ou sensible à l'administration d'anti-inflammatoire.

Les valeurs usuelles de TTR chez les animaux et l'influence de l'environnement n'ont pas été investiguées vu la nature préliminaire des études pour TTR. Par exemple, les résultats de l'étude #3 chez le chien arthrosique ne définissent pas les concentrations basales de TTR en absence de douleur. Également, nos résultats ne permettaient pas d'étudier les autres critères de régulation de TTR, tels que, par exemple, la variabilité circadienne ou celle liée à l'âge (Kawahara et al., 2011). Dès lors, la validation de cette mesure devrait reposer sur un dosage des changements de concentrations de TTR suivant différentes conditions de douleur et lors de différents traitements

analgésiques afin de mesurer à la fois la sensibilité et la spécificité de la mesure.

4.3.3.9 Synthèse

Ces résultats obtenus chez le chien sont cohérents avec les observations faites chez les bovins. Une comparaison des qualités métrologiques des mesures confirme le tri des méthodes réalisées au cours de l'étude #1. Les mesures multifactorielles telles que les échelles composites (SVAPS, STAPS, MFQ, 4A-VET) ne présentent pas les meilleures qualités métriques pour la mesure de la douleur. Les mesures comportementales obtenues à l'aide de la vidéo-analyse présentent les meilleures qualités métrologiques mais seuls certains comportements sont des indicateurs fiables et valides de la douleur. En particulier, la fréquence de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' à l'aide de la vidéo-analyse (études #2 et #3) et le PFV (études #3 et #4) sont des mesures simples, sensibles à la douleur et conservées entre les études de recherche en douleur orthopédique. La baisse de l'activité motrice comme indicateur de douleur devrait être confirmée par une mesure des changements de comportement. L'AED pourrait être une mesure de la douleur mais serait sensible à la présence de facteurs confondants et semblerait une mesure de la douleur aiguë. Finalement, l'étude #3 confirme que les chiens arthrosiques présentent de la sensibilisation centralisée marquée par une réponse aux QST diminués ainsi que par des modifications de neuropeptides spinaux.

4.3.4 Les liens entre les mesures de la douleur orthopédique

Selon la définition de la douleur, plusieurs méthodes permettent de mesurer la douleur. Les mesures usuelles de la boiterie et de la perception

douloureuse sont respectivement la mesure de PFV et celle de la sensibilisation. Afin d'établir la validité et l'interprétation des mesures, nous allons présenter les liens qui unissaient les mesures entre elles. Plus particulièrement, l'étude des associations permettra de clarifier le lien qui unit la mesure de la boiterie et celle de la douleur. Ensuite, nous allons présenter comment la corrélation de ces méthodes s'intègre dans les connaissances actuelles sur la validation des mesures de la douleur.

4.3.4.1 La douleur orthopédique induit des troubles de la locomotion et de la boiterie

Le point commun à l'ensemble des trois études de douleur orthopédique est une diminution de la locomotion et une augmentation des troubles de la démarche en présence de douleur. Chez les chiens ayant répondu aux traitements, on observe une diminution des scores comportementaux de douleur de 4A-VETleg (étude #2) et de CSOM (étude #4), une augmentation de l'activité locomotrice (étude #4), une augmentation de la fréquence de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' (études #2 et #3), une augmentation de la fréquence de 'la station debout avec plein appui de la patte opérée' et du 'trot avec plein appui de la patte opérée' (étude #3), une augmentation de la force d'appui de la patte au sol (PFV) (études #3 et #4). Ces expressions comportementales sont cohérentes avec la baisse de la force d'appui au sol des pattes des chiens lors de douleur orthopédique inflammatoire (Borer et al., 2003; Hazewinkel et al., 2003) et d'arthrose (Hielm-Björkman et al., 2009c).

Unanimement, la convergence des résultats défendrait la validité des mesures objectives de la boiterie, de la fonction locomotrice et des scores des échelles de douleur comportementales ayant des items associés à la boiterie

(Conzemius et al., 2005; Brown et al., 2007; Walton et al., 2013) pour l'étude de la douleur orthopédique. Cependant, les résultats de recherche montrent que la boiterie, la fonction locomotrice et les scores des échelles sont variablement corrélés les uns aux autres. En effet, les scores des échelles de douleur SVAPS, STAPS et VAS étaient variablement corrélés à la mesure du PFV lors de douleur orthopédique induite chirurgicalement (étude #3). Les changements de CSOM étaient corrélés à ceux de PFV lors d'arthrose naturelle (étude #4). Les paramètres cinétiques (PFV et index de symétrie) sont significativement et faiblement corrélés aux scores de douleur obtenus avec LOAD et CBPI chez des chiens arthrosiques (Walton et al., 2013). À l'inverse, une autre étude de corrélation entre les scores de CBPI et la mesure de PFV sur soixante six chiens arthrosiques a démontré une absence de corrélation entre le PFV et les scores de l'échelle de douleur CBPI (Brown et al., 2013). Comme discuté précédemment, les échelles subjectives, entre elles, présentent des qualités métrologiques de précision et de validité différentes. Dès lors des résultats discordants entre la mesure subjective de la douleur (échelles de douleur) et celle objective de la boiterie (PVF) peuvent être expliqués par des sensibilités et des spécificités différentes entre les mesures objectives et subjectives de la boiterie (Wiseman-Orr et al., 2006; Waxman et al., 2008; Hielm-Björkman et al., 2011).

Il est évident que PFV est une mesure objective de la boiterie et l'accéléromètre est une mesure de l'intensité de l'activité locomotrice (Hansen et al., 2007; Dow et al., 2009). Si l'activité motrice est convergente avec PVF, les données additionnelles de l'étude #3 et l'étude #4 démontreraient que l'activité motrice n'avait pas de corrélation avec le PFV. Ces résultats sont contradictoires avec la mise en évidence récente que l'augmentation globale de l'activité d'une durée de 54 minutes est associée à une

augmentation de PVF de 4,4% chez le chien arthrosique (Moreau et al., 2013). L'apparente contradiction entre les résultats d'étude est en partie expliquée par une approche analytique qui ne permet pas de comparer les études. En effet, Moreau *et al.* (2013) ont établi un lien entre une mesure globale de PVF et une mesure globale de l'activité motrice moyennée sur une période totale de 6 semaines (Moreau et al., 2013). Cette méthode est justifiée car l'arthrose présente des phases d'amélioration et de détérioration autour d'une tendance générale de diminution des capacités fonctionnelles et locomotrices en lien avec la progression de la maladie. Cette approche méthodologique semblerait ainsi moins sensible aux variations journalières de l'activité locomotrice. Surtout, cette approche méthodologique tendrait à donner une validité prédictive de l'activité motrice en prenant pour référence la mesure de PVF. À l'inverse, les études #3 et #4 établissaient un lien entre une mesure ponctuelle de PVF et une mesure de l'activité motrice toutes deux répétées sur des intervalles de temps de 8 semaines (étude #3) et de 12 semaines (étude #4). Cette approche évaluerait la répétition de la corrélation au cours du temps. Ici, le manque de lien clair entre le PVF et l'activité locomotrice suggèrerait que les deux variables n'évolueraient pas de façon synchrone ou n'auraient pas la même sensibilité au changement. Cette divergence méthodologique traduit également la difficulté à comparer une mesure ponctuelle avec une mesure continue et aussi argumenterait sur l'intérêt à utiliser ces deux types de mesure. À ce stade de connaissance, les mesures sont des mesures fonctionnelles, PVF et activité locomotrice, et sont convergentes. Il serait nécessaire de confirmer le lien de l'activité motrice à la mesure de PVF pour confirmer à la fois la validité concurrente, voire la validité prédictive décrite pour l'arthrose du chien sur 6 semaines de mesure (Moreau et al., 2013)..

L'étude des corrélations montre également que le PFV était positivement corrélé à la fréquence de la 'marche avec plein appui de la patte opérée' et la fréquence 'la position debout avec plein appui de la patte opérée', deux comportements indicateurs de la fonction locomotrice et de la posture. Conjointement à une mesure objective du comportement, l'étude #4 démontrait que l'activité motrice était corrélée aux scores de CSOM. Ces résultats suggéraient que la douleur orthopédique présentait différents aspects : une incapacité fonctionnelle locomotrice mesurée par le PFV et une modification de la qualité de vie quantifiable par la mesure de l'activité motrice et CSOM. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de Brown *et al.* (2013), qui suggèrent que l'échelle CBPI est une mesure de la qualité de vie sensible à la présence de douleur chronique alors que le PFV est une mesure objective de la boiterie de la patte arthrosique.

4.3.4.2 Le lien entre les mesures et la sensibilisation

Les études de la douleur sur des modèles canins de cristaux d'urate montrent que les mesures de la boiterie ne répondent pas ou peu aux traitements analgésiques que sont un antagoniste des récepteurs *NMDA* (Budsberg et al., 2011), un antagoniste de récepteur vanilloïde (Cathcart et al., 2011), un antagoniste au récepteur neurokinine-1 (Punke et al., 2007). En revanche, les mesures objectives de la boiterie, de la fonction locomotrice et des scores des échelles sont sensibles aux traitements anti-inflammatoires (Budsberg et al., 2002; Budsberg et al., 2011). Il est possible que les analgésiques testés (antagonistes des récepteurs *NMDA*, vanilloïde et neurokinine-1) aient une faible activité analgésique par comparaison aux morphiniques et aux anesthésiques locaux. Il est également possible que les mesures objectives de la boiterie soient sensibles à l'inflammation mais soient

peu sensibles aux analgésiques testés sur le modèle de synovite. De plus, parmi ces études, la sensibilisation centrale n'avait pas été mesurée pour tester l'efficacité des analgésiques à diminuer la douleur (Punke et al., 2007; Budsberg et al., 2011; Cathcart et al., 2011) alors que les chiens arthrosiques auraient une sensibilisation centrale mesurable à l'aide de tests quantitatifs de sensibilité mécanique et au froid (Brydges et al., 2012). Dès lors, de tels résultats ne permettaient pas d'étudier le lien entre les mesures de la douleur et la sensibilisation.

Pour établir la validation des méthodes de mesure et identifier les liens entre les mesures associées à la douleur et la sensibilisation, l'étude #3 employait une double stratégie. La première stratégie était liée au choix du traitement. En effet, la diminution de la douleur était associée à un traitement qui module l'évolution de l'arthrose. Les biphosphonates ne sont pas des analgésiques et ne présentent pas de propriété sédative (Monkkonen et al., 1998; Yu et al., 2012), or l'effet sédatif des médicaments, par exemple, induit des changements de comportements qui sont confondus avec ceux de la douleur chez les chiens suivant une procédure (Guillot et al., 2011) ou chez les chiens arthrosique traités avec du tramadol (Malek et al., 2012). De façon intéressante, le tiludronate diminue l'inflammation, la résorption osseuse au niveau de l'articulation et diminue tardivement la sensibilisation suivant un test de sensibilité mécanique suivant les 2 et 4 semaines après l'administration intra-articulaire de Complément de Freund chez le rat (Bertaim et al., 2013). Ces QST seraient sensibles à l'effet du tiludronate sur l'articulation, ce qui suppose une modulation de la sensibilisation avec un traitement au tiludronate. La deuxième stratégie consistait à mesurer la sensibilisation sur différentes zones cutanées pour évaluer l'extension de la douleur centralisée, comme il est réalisé chez les patients humains atteints

d'arthrose (Bajaj et al., 2001; Arendt-Nielsen et al., 2010). Ainsi, l'étude #3 permettait de confirmer la sensibilisation centrale chez le chien arthrosique et de comprendre le lien entre les mesures fonctionnelles et celles de la sensibilisation centrale en absence de traitement à effet sédatif ou analgésique. Finalement, la différence entre la sensibilisation périphérique et la sensibilisation centrale nous a permis d'établir des hypothèses de liens qui unissent la mesure de la sensibilisation aux mesures usuelles la douleur lors d'arthrose.

De l'étude des associations entre les méthodes chez le chien, le programme de recherche permettrait de distinguer deux groupes de méthodes de mesure de la douleur orthopédique. Tout d'abord, la sensibilisation périphérique était positivement associée à une diminution du comportement de 'la marche avec plein appui de la patte opérée' et du PFV. Cela suggérait que la diminution de la douleur locale était associée une augmentation du comportement de la marche normale et une augmentation de la force d'appui de la patte boiteuse. Ensuite, la sensibilisation centrale était associée à une diminution de PFV. Cela suggérait qu'une diminution de la douleur centralisée était associée une augmentation de la force d'appui de la patte boiteuse lors de l'étude cinétique de la marche. De plus, PFV était sensible à l'effet du tiludronate lorsque la sensibilisation centrale était un facteur explicatif de PFV.

Le comportement de 'la marche avec plein appui de la patte opérée' était négativement associé à la sensibilisation centrale. Le comportement de 'la marche avec plein appui de la patte opérée' différenciait les groupes de traitement lorsque la sensibilisation centrale était un facteur explicatif des changements de 'la marche avec plein appui de la patte opérée'. Cette relation traduit une adaptation comportementale en lien avec une sensibilisation

centrale en cas d'arthrose chez le chien. Dans l'étude #2, ce même critère comportemental différenciait le groupe tramadol du groupe placebo 24 heures après la chirurgie et ne différenciait pas le groupe analgésie multimodale du groupe placebo. Dans l'ensemble, les résultats suggèrent l'intérêt de cette mesure pour la douleur comme étant une mesure de l'activité spontanée associée à la douleur et sensible aux traitements.

Le lien entre la douleur et l'activité motrice n'avait pas été étudiée jusqu'à ce jour. Décrite pour la première fois chez le chien, la sensibilisation centrale était associée à une augmentation de l'activité motrice (étude #3). De ces résultats, il est difficile de savoir si les chiens arthrosiques avaient plus d'hyperalgésie parce qu'ils avaient plus d'activité locomotrice ou si l'hyperalgésie entraînait de la douleur au point que les chiens présentaient de l'agitation mesurable par une activité motrice persistante. Toutefois, Wernham *et al.* (2011), ont observé que l'activité motrice augmentait chez des chiens arthrosiques ayant une administration quotidienne d'anti-inflammatoire, mais deux semaines après l'initiation du traitement, l'activité motrice baissait alors même que les chiens étaient encore sous traitement anti-inflammatoire (Wernham *et al.*, 2011). Cela suggérerait une autre explication de la relation positive entre l'hyperalgésie et l'augmentation de l'activité motrice révélée par l'étude #3. On pourrait supposer que les chiens sous traitement anti-inflammatoire prolongé solliciteraient plus leurs articulations, ce qui entraînerait plus de stimulations nociceptives associées au mouvement et donc un maintien de l'hyperalgésie centrale. La raison qui lie la sensibilisation à l'activité motrice devrait être étudiée afin de faciliter l'interprétation des mesures de l'activité motrice. Tout d'abord, la mesure de l'intensité de l'activité motrice simultanément à celle des comportements spontanés permettrait d'interpréter l'augmentation de l'activité motrice en

lien avec le comportement exprimé (Yamada and Tokuriki, 2000). Ensuite, l'étude des ondes nociceptives à l'aide de mesure électromyographique au cours de la marche chez des chiens traités par comparaison à des chiens non traités pourraient préciser si une sollicitation de l'articulation augmente la réponse neuronale centrale.

4.3.4.3 La réduction des méthodes d'évaluation

Le point important du programme de recherche est d'affiner la validation des méthodes en associant les mesures des méthodes comportementales et physiologiques aux mesures de la sensibilisation.

Dans l'étude #3, en absence d'étude d'association entre les méthodes, les mesures valides qui démontraient une diminution de la douleur avec le tiludronate regroupaient la mesure du PFV, 'la marche avec plein appui de la patte opérée', 'le trot avec plein appui de la patte opérée', 'la station debout avec plein appui de la patte opérée en tenant la tête haute' et, à la limite de la significativité, l'AED (Moreau et al., 2011). En tenant compte de la sensibilisation centrale, les méthodes qui distinguaient les groupes de traitement étaient le PFV, 'la marche avec plein appui de la patte opérée', l'AED. Ces résultats supportaient que ces trois mesures étaient associées à la douleur et également ces trois mesures étaient sensibles à l'effet du tiludronate. Également, cela suggérait qu'en absence d'étude d'association entre les méthodes, il y aurait eu une sous-estimation du potentiel du traitement à diminuer la douleur sur la base de la seule différence entre les groupes.

Si la sous-estimation de l'efficacité de nouvelles molécules analgésiques est l'une des principales critiques adressée aux modèles animaux (Rice et al., 2008), le manque de translation des résultats entre des

modèles pathologiques communs (par exemple des modèles chimiques et des modèles chirurgicaux d'arthrose) pourrait également être dû à une surestimation du potentiel analgésique de nouvelles thérapeutiques. En effet, pour augmenter les chances d'observer un effet de traitement, une multitude de méthodes de mesure sont usuellement associées à la douleur afin de tester l'efficacité analgésique de nouvelles thérapies, pratiques et protocoles thérapeutiques. Outre les difficultés des modèles animaux et des méthodes à reproduire les symptômes de la douleur chez l'homme (Mogil, 2009; Berge, 2011), il est possible que l'augmentation du nombre des méthodes pour évaluer la douleur augmente la probabilité par chance de voir une différence significative entre les groupes. Dès lors, l'interprétation des résultats devient complexe lorsque ces résultats sont discordants et non reliés à la mesure de la douleur. En démontrant un lien entre les mesures usuelles et la sensibilisation, le programme de recherche offre la possibilité de réduire le nombre de méthodes de mesure de la douleur sur nos modèles animaux. Ces observations corroborent également les travaux de Mogil *et al.*, (2010) sur des modèles neuropathiques chez les rongeurs, qui encouragent à trier les méthodes de mesure de la douleur pour ne garder que les méthodes dont la mesure est significativement liée à la douleur. La multitude des méthodes de mesure de la douleur a d'ailleurs été soulevé par l'IMMPACT (Turk et al., 2008). Il y est recommandé de classifier les méthodes de mesure selon que cette mesure est de premier ordre (*first outcome*), ou non, en fonction de leur réelle validité à la douleur. Si nécessaire, le seuil de significativité des tests doit être corrigé du nombre de mesures utilisées. Cette technique analytique a été testée dans l'étude #4.

En synthèse, les résultats démontrent surtout que la méthode choisie doit avoir un lien clair à la présence de la sensibilisation centrale ou un

marqueur valide du mécanisme de la douleur causée par la maladie sous-jacente. La boiterie et l'activité locomotrice semblent indissociables de la mesure de la douleur due à l'arthrose. Ces paramètres peuvent être évalués à l'aide de plusieurs méthodes qualitatives (grille de sévérité de la boiterie par exemple) et quantitatives (mesure des forces d'appui au sol, mesure de l'activité comportementale, comme par exemple la mesure de la fréquence d'appui de la patte au sol sur un intervalle de temps donnée). Chacune de ces mesures présentent des facteurs confondants, des interprétations uniques et des précisions de mesure propres à chaque méthode. Cependant, les résultats de recherche suggéraient que la mesure du décompte de 'la marche avec plein appui de la patte opérée' était une mesure valide pour l'arthrose (étude #3) mais aussi pour la douleur aigüe (étude #2). Pour le PVF, il n'est pas exclu que les instabilités biomécaniques induites par les lésions articulaires d'origine chirurgicale ou l'arthrose articulaire soient des facteurs confondants dans la mesure de la douleur orthopédique. Néanmoins, le PVF serait uniformément au centre de la mesure de la douleur en faisant le lien entre les lésions articulaires (Moreau et al., 2013) et inflammatoires (Moreau et al., 2011), les changements du comportement spontané et habituel (respectivement la vidéo-analyse pour l'étude #3 et CSOM pour l'étude #4) et la sensibilisation (étude #3).

4.4 Les points novateurs et les limites du programme de recherche

Les points novateurs de ce programme sont associés à l'idée originale que la douleur peut être mesurée par des méthodes qui mesurent des aspects identiques de la douleur (par exemple, la sensibilisation) pour des conditions

différentes et des espèces différentes chez les animaux. De cette idée, les mêmes instruments (adaptés à l'espèce) ont été testés pour leurs fiabilités et leurs validités chez la vache et le chien. La mise en commun des résultats des différentes études a permis de comparer des méthodes selon leurs résultats de fiabilités et de validités. La validation de l'utilisation des méthodes est sur la base d'une évaluation uniforme et cohérente entre les espèces utilisées dans ce programme.

La recherche a permis le développement de nouvelles méthodes et de méthodologie de mesure comme celles de la sensibilisation chez la vache (test de sensibilisation répétée au niveau des 4 pattes et dosage de biomarqueurs), le développement d'éthogrammes pour l'étude du comportement (vache et chien) à l'aide de la vidéo-analyse, l'identification de comportements indicateurs de douleur pour les modèles étudiés et enfin, le dosage de la transthyrétine qui jusqu'à ce jour n'était pas citée comme un bio-marqueur associé à la douleur.

La recherche a enrichi notre connaissance sur les changements de comportements affectés par la douleur, à la fois visibles grâce à la vidéo-analyse et la bio-téléométrie, et également observés par les propriétaires de chien, dans le cas du CSOM. Les stratégies de calcul des associations entre les résultats de mesure a permis de mieux comprendre les relations entre les changements observés dus à une cause commune qui est la douleur.

Les limites de ce programme sont associées à : (1) une définition et un construit de la douleur vagues chez l'animal, ce qui peut limiter l'interprétation et la validité de l'utilisation des mesures de la douleur choisies pour répondre au construit, (2) un construit qui ne permet pas de tester les facteurs confondants et d'influence sur les mesures (par exemple mesurer un changement de comportement qui soit significatif dans ce

programme mais qui pourrait être différent en présence ou non de l'observateur), (3) une sélection arbitraire de méthodes (par exemple la mesure de l'AED) pour mesurer un domaine (ici la réponse du système nerveux autonome) alors que d'autres méthodes (par exemple, la mesure de la variabilité cardiaque, ou la thermographie oculaire...) pourraient avoir de meilleures qualités psychométriques pour la mesure du domaine, (4) une absence de mesure de référence pour la mesure de la douleur chez le chien et le bovin, (5) des études qui demeurent préliminaires en raison de petits échantillonnages, dans des conditions non multicentriques et dont les résultats doivent être confirmés, (6) un manque de développement et de validation préliminaire des échelles d'intensité de douleur, (7) des résultats qui devraient être confirmés pour d'autres conditions de douleur.

5 CONCLUSION

Une raison fréquemment invoquée pour expliquer les lacunes en matière de diagnostic et de traitement de la douleur est l'absence de validation et d'utilité des méthodes disponibles en médecine vétérinaire. La validation des méthodes de la douleur chez les animaux est un véritable souci car l'investissement de la recherche dans ce domaine est très insuffisant en comparaison des modèles de recherche chez les rongeurs et en médecine humaine. Lorsque le programme de recherche a commencé, il était très difficile de faire un choix des méthodes de mesure de la douleur pour tester ou développer de nouvelles gammes thérapeutiques. L'objectif de ce programme était de dresser une liste de méthodes validées pour l'étude de la douleur en médecine vétérinaire chez le bovin et chez le chien. Le programme de recherche en plusieurs étapes a permis de faire une présélection de méthodes d'intérêt (étude vache) puis de valider des méthodes en comparant les résultats de recherche chez le chien dans des conditions différentes de douleur orthopédique (aigüe ou chronique, expérimentale ou clinique). La validation de l'utilisation des méthodes tenait compte de la capacité à différencier des intensités de douleur, de la convergence des mesures mais également des liens qui unissaient les mesures entre elles.

Le travail de recherche conduit sur une période de 6 ans, combiné aux travaux de recherche les plus actuels, a substantiellement avancé les connaissances sur la validation de la douleur chez les chiens et les bovins. Un grand nombre de travaux supporte l'étude de la douleur en utilisant des méthodes uniformément admises et conformes à la définition de la douleur animale. Nos résultats ont permis de faire un tri parmi les méthodes utilisées et de sélectionner les mesures objectives, spécifiques, unimodales et prédictives. Plutôt que de mesurer différentes facettes de la douleur, notre

étude revendiquerait l'étude de la douleur à l'aide d'un **nombre restreint de méthodes**.

Deux méthodes permettaient uniformément de mesurer la douleur chez le bovin et le chien : l'étude de la sensibilisation et l'étude des comportements à l'aide la vidéo-analyse. De façon intéressante, la mesure de la sensibilisation était un marqueur de la douleur pathologique quelque soit l'espèce et le modèle. La vidéo-analyse est une méthode de quantification des comportements dont les mesures sont spécifiques du modèle de douleur, et également de l'espèce étudiée.

Ces résultats de recherche ouvrent de nouvelles perspectives en médecine vétérinaire pour l'étude de la douleur. Il semble indispensable d'étudier la douleur à l'aide, au moins, de la mesure de la sensibilisation et de l'étude du comportement avec la vidéo-analyse. Le PFV demeure une mesure objective de la boiterie dont le lien à la douleur chez le chien est confirmé par ce programme de recherche. Ces méthodes usuelles seraient des méthodes de référence pour définir respectivement les profils sensitifs et comportementaux de la douleur. Il serait utile d'évaluer des stratégies d'implantation de ces outils en pratique vétérinaire, confirmer la validation et établir la faisabilité et l'utilité de ces méthodes sur la base d'études multicentriques.

La vidéo-analyse a permis de sélectionner des comportements variablement utilisés pour la mesure de la douleur. Du point de vue de la recherche, les orientations futures seraient 1) de développer des méthodes de mesure associées à ces comportement (grille de comportement par exemple), de tester la fiabilité et d'identifier les sources d'erreur de ces mesures, 2) d'établir un programme de validation de ces comportements sur de nouvelles populations, programme pour lequel les facteurs confondants seraient à identifier et l'interprétation des mesures devrait être réalisée dans le contexte

de l'étude en lien avec l'hypothèse de la recherche, 3) les fréquences de mesure, la durée et les conditions des mesures des comportements seraient à identifier pour standardiser la mesure. Également, en l'absence d'échelle de douleur chez le bovin et pour les échelles d'intensité de douleur chez le chien dont la validité d'utilisation est contestable, l'identification de comportements à l'aide de la vidéo-analyse pourrait être une source de développement d'échelle d'intensité de douleur dont la validité devrait être étudiée.

Les mesures de la sensibilisation centralisée sont récemment développées chez le chien et utilisées chez la vache. La difficulté revient surtout à obtenir des mesures fiables. Nous recommandons 1) d'étudier les sources d'erreur des mesures de la sensibilisation, 2) de dresser une méthodologie standardisée d'application du test et de procédure d'analyse des résultats des mesures pour en vérifier la fiabilité et la validité, 3) de comparer la fiabilité et la validité de différentes méthodes de tests nociceptifs 4) de dresser une cartographie des zones de sensibilisation en fonction de la progression de la douleur comme il est réalisé chez le patient arthrosique (Arendt-Nielsen et al., 2010).

L'identification de la TTR est une nouvelle opportunité d'étudier les effets de la douleur au niveau du système nerveux central. Beaucoup de travail reste à faire avant d'établir si la TTR est un marqueur valide de la douleur pathologique, mais il est possible d'entrevoir l'intérêt de cette protéine comme un marqueur potentiel de douleur ou de bien-être chez l'animal en évaluant 1) les variations physiologiques de TTR dans chaque espèce, 2) l'association des changements de concentrations de TTR avec d'autres bio-marqueurs cérébro-spinaux, 3) les effets des principaux analgésiques sur les concentrations de TTR, 4) en validant l'utilisation de la mesure de TTR pour différentes conditions de douleur.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Abramson S, Attur M (2009). Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 11(3): 227.
- Adams ME, Pelletier J-P (1988). The canine anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. Handbook of Animal Models for Arthritis Research. Greenwald RA and Diamond HS. Boca Raton, CRC: 57-87.
- Afjehi-Sadat L, Brejnikow M, Kang SU, Vishwanath V, Walder N, Herkner K, Redl H, Lubec G (2010). Differential protein levels and post-translational modifications in spinal cord injury of the rat. *J Proteome Res* 9(3): 1591-1597.
- Afrah AW, Fiska A, Gjerstad J, Gustafsson H, Tjolsen A, Olgart L (2002). Spinal substance P release in vivo during the induction of long-term potentiation in dorsal horn neurons. *Pain* 96: 49 - 55.
- Altman RD, Kates J, Chun LE, Dean DD, Eyre D (1992). Preliminary observations of chondral abrasion in a canine model. *Ann Rheum Dis* 51(9): 1056-1062.
- American Educational Research Association (1999). Standards for educational and psychological testing. Washington, American Educational Research Association,.
- Anil L, Anil SS, Deen J (2005). Pain detection and amelioration in animals on the farm: issues and options. *J Appl Anim Welf Sci* 8(4): 261-278.
- Anil SS, Anil L, Deen J (2002). Challenges of pain assessment in domestic animals. *J Am Vet Med Assoc* 220(3): 313-319.
- Apkarian AV (2011). The brain in chronic pain: clinical implications. *Pain Manag* 1(6): 577-586.

- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede R-D, Zubieta J-K (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9(4): 463-484.
- Arendt-Nielsen L, Brennum J, Sindrup S, Bak P (1994). Electrophysiological and psychophysical quantification of temporal summation in the human nociceptive system. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68(3): 266-273.
- Arendt-Nielsen L, Mansikka H, Staahl C, Rees H, Tan K, Smart TS, Monhemius R, Suzuki R, Drewes AM (2011). A translational study of the effects of ketamine and pregabalin on temporal summation of experimental pain. *Reg Anesth Pain Med* 36(6): 585-591.
- Arendt-Nielsen L, Nie H, Laursen MB, Laursen BS, Madeleine P, Simonsen OH, Graven-Nielsen T (2010). Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *Pain* 149(3): 573-581.
- Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D (2009). Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* 10(6): 556-572.
- Baastrop C, Maersk-Moller CC, Nyengaard JR, Jensen TS, Finnerup NB (2010). Spinal-, brainstem- and cerebrally mediated responses at- and below-level of a spinal cord contusion in rats: Evaluation of pain-like behavior. *Pain* 151(3): 670-679.
- Bajaj P, Bajaj P, Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L (2001). Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: An experimental controlled study. *Pain* 93(2): 107-114.

- Baldridge SL, Coetzee JF, Dritz SS, Reinbold JB, Gehring R, Havel J, Kukanich B (2011). Pharmacokinetics and physiologic effects of intramuscularly administered xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride-butorphanol tartrate alone or in combination with orally administered sodium salicylate on biomarkers of pain in Holstein calves following castration and dehorning. *Am J Vet Res* 72(10): 1305-1317.
- Bartalena L, Farsetti A, Flink IL, Robbins J (1992). Effects of interleukin-6 on the expression of thyroid hormone-binding protein genes in cultured human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *Mol Endocrinol* 6(6): 935-942.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139(2): 267-284.
- Bateson P (1991). Assessment of pain in animals. *Anim Behav* 42(5): 827-839.
- Beaudry F, Ferland CE, Vachon P (2009). Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 23(9): 940-950.
- Beaudry F, Vachon P (2006). Determination of substance P in rat spinal cord by high-performance liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 20(12): 1344-1350.
- Bendele AM (2001). Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 1(4): 363-376.

- Bergadano A, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Schatzmann U, Spadavecchia C (2006). Quantitative assessment of nociceptive processes in conscious dogs by use of the nociceptive withdrawal reflex. *Am J Vet Res* 67(5): 882-889.
- Bergadano A, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Spadavecchia C (2007). Noninvasive assessment of the facilitation of the nociceptive withdrawal reflex by repeated electrical stimulations in conscious dogs. *Am J Vet Res* 68(8): 899-907.
- Bergadano A, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Spadavecchia C (2009a). Modulation of nociceptive withdrawal reflexes evoked by single and repeated nociceptive stimuli in conscious dogs by low-dose acepromazine. *Vet Anaesth Analg* 36(3): 261-272.
- Bergadano A, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Theurillat R, Thormann W, Spadavecchia C (2009b). Plasma levels of a low-dose constant-rate-infusion of ketamine and its effect on single and repeated nociceptive stimuli in conscious dogs. *Vet J* 182(2): 252-260.
- Bergamasco L, Coetzee JF, Gehring R, Murray L, Song T, Mosher RA (2011). Effect of intravenous sodium salicylate administration prior to castration on plasma cortisol and electroencephalography parameters in calves. *J Vet Pharmacol Ther* 34(6): 565-576.
- Berge O-G (2011). Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br J Pharmacol* 164(4): 1195-1206.
- Bergmann HM, Nolte I, Kramer S (2007). Comparison of analgesic efficacy of preoperative or postoperative carprofen with or without preincisional mepivacaine epidural anesthesia in canine pelvic or femoral fracture repair. *Vet Surg* 36(7): 623-632.

- Bertaim T, Chapuy E, Caussade F, Ardid D (2013). Dose and administration schedule effect of tiludronate on joint damage in the model of complete Freund adjuvant induced monoarthritis in rats. *Open J Rheum Autoimmune Dis* 3: 18-25.
- Bey MJ, Kline SK, Baker AR, McCarron JA, Iannotti JP, Derwin KA (2011). Estimation of dynamic, in vivo soft-tissue deformation: Experimental technique and application in a canine model of tendon injury and repair. *J Orthop Res* 29(6): 822-827.
- Binder W, Mousa SA, Sitte N, Kaiser M, Stein C, Schäfer M (2004). Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci* 20(1): 92-100.
- Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R (2007). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: A randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther* 8(4): 272-284.
- Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE (2001). Chronic pain, chronic stress and depression: Coincidence or consequence? *J Neuroendocrinol* 13(12): 1009-1023.
- Blackburn Munro G (2004). Hypothalamo-pituitary-adrenal axis dysfunction as a contributory factor to chronic pain and depression. *Curr Pain Headache Rep* 8(2): 116-124.
- Bockstahler BA, Henninger W, Müller M, Mayrhofer E, Peham C, Podbregar I (2007). Influence of borderline hip dysplasia on joint kinematics of

- clinically sound Belgian Shepherd dogs. *Am J Vet Res* 68(3): 271-276.
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Brunet J, Tardif G, Schrier D, Flory C, El-Kattan A, Boily M, Pelletier J-P (2005). Oral treatment with PD-0200347, an $\alpha 2\delta$ ligand, reduces the development of experimental osteoarthritis by inhibiting metalloproteinases and inducible nitric oxide synthase gene expression and synthesis in cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum* 52(2): 488-500.
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Paré F, Troncy E, Moreau M, Pelletier J-P (2010). Oral treatment with a *Brachystemma calycinum* D don plant extract reduces disease symptoms and the development of cartilage lesions in experimental dog osteoarthritis: Inhibition of protease-activated receptor 2. *Ann Rheum Dis* 69(6): 1179-1184.
- Bomholt SF, Harbuz MS, Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE (2004). Involvement and role of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) stress axis in animal models of chronic pain and inflammation. *Stress* 7(1): 1-14.
- Borer LR, Peel JE, Seewald W, Schawalder P, Spreng DE (2003). Effect of carprofen, etodolac, meloxicam, or butorphanol in dogs with induced acute synovitis. *Am J Vet Res* 64(11): 1429-1437.
- Borish L, King MS, Mascali JJ, Johnson S, Coll B, Rosenwasser LJ (1992). Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation*. 16(5): 471-484.
- Borsboom D, Mellenbergh GJ, van Heerden J (2004). The concept of validity. *Psychol Rev* 111(4): 1061-1071.

- Bosmans T, Gasthuys F, Duchateau L, de Bruin T, Verhoeven G, Polis I (2007). A comparison of tepoxalin-buprenorphine combination and buprenorphine for postoperative analgesia in dogs: A clinical study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54(7): 364-369.
- Bourguignat A, Féraud G, Jenny JY, Gaudias J, Kempf I (1996). Diagnostic value of C-reactive protein and transthyretin in bone infections of the lower limb. *Clin Chim Acta* 255(1): 27-38.
- Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, Osborn MN, Sanchez BM, Guzman RE, Hook KE, Juneau PL, Connor JR, Kilgore KS (2006). Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage* 14(10): 1041-1048.
- Boyce-Rustay JM, Zhong C, Kohnken R, Baker SJ, Simler GH, Wensink EJ, Decker MW, Honore P (2010). Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology* 58(2): 537-543.
- Bradesi S, Kokkotou E, Simeonidis S, Patierno S, Ennes HS, Mittal Y, McRoberts JA, Ohning G, McLean P, Marvizon JC, Sternini C, Pothoulakis C, Mayer EA (2006). The role of neurokinin 1 receptors in the maintenance of visceral hyperalgesia induced by repeated stress in rats. *Gastroenterology* 130(6): 1729-1742.
- Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M (1991). Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: A bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol.* 18(3): 436-446.

- Brandt KD, Dieppe P, Radin EL (2009). Commentary: Is it useful to subset "primary" osteoarthritis? A critique based on evidence regarding the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 39(2): 81-95.
- Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L (2006). Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* 65(10): 1261-1264.
- Breinan HA, Hsu HP, Spector M (2001). Chondral defects in animal models: Effects of selected repair procedures in canines. *Clin Orthop Relat Res*(391 Suppl): S219-230.
- Briley JD, Williams MD, Freire M, Griffith EH, Lascelles BDX (2013). Feasibility and repeatability of cold and mechanical quantitative sensory testing in normal dogs. *Vet J*: Article in press.
- Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT (2007). Development and psychometric testing of an instrument designed to measure chronic pain in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res* 68(6): 631-637.
- Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT (2008). Ability of the Canine Brief Pain Inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 233(8): 1278-1283.
- Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT (2009). A novel approach to the use of animals in studies of pain: Validation of the Canine Brief Pain Inventory in canine bone cancer. *Pain Med* 10(1): 133-142.
- Brown DC, Boston RC, Farrar JT (2010a). Use of an activity monitor to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 237(1): 66-70.

- Brown DC, Boston RC, Farrar JT (2013). Comparison of force plate gait analysis and owner assessment of pain using the Canine Brief Pain Inventory in dogs with osteoarthritis. *J Vet Intern Med* 27(1): 22-30.
- Brown DC, Iadarola MJ, Perkowski SZ, Erin H, Shofer F, Laszlo KJ, Olah Z, Mannes AJ (2005). Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. *Anesthesiology* 103(5): 1052-1059.
- Brown DC, Michel KE, Love M, Dow C (2010b). Evaluation of the effect of signalment and body conformation on activity monitoring in companion dogs. *Am J Vet Res* 71(3): 322-325.
- Bruehl S, Chung OY (2004). Interactions between the cardiovascular and pain regulatory systems: An updated review of mechanisms and possible alterations in chronic pain. *Neurosci Biobehav Rev* 28(4): 395-414.
- Brydges NM, Argyle DJ, Mosley JR, Duncan JC, Fleetwood-Walker S, Clements DN (2012). Clinical assessments of increased sensory sensitivity in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Vet J* 193(2): 545-550.
- Budsberg SC (2001). Long-term temporal evaluation of ground reaction forces during development of experimentally induced osteoarthritis in dogs. *Am J Vet Res* 62(8): 1207-1211.
- Budsberg SC, Cross AR, Quandt JE, Pablo LS, Runk AR (2002). Evaluation of intravenous administration of meloxicam for perioperative pain management following stifle joint surgery in dogs. *Am J Vet Res* 63(11): 1557-1563.

- Budsberg SC, Johnston SA, Schwarz PD, DeCamp CE, Claxton R (1999). Efficacy of etodolac for the treatment of osteoarthritis of the hip joints in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 214(2): 206-210.
- Budsberg SC, Torres BT, Zwijnenberg RJ, Eppler CM, Clark JD, Cathcart CJ, Reynolds LR, Al-Nadaf S (2011). Effect of perzinfotel and a proprietary phospholipase A2 inhibitor on kinetic gait and subjective lameness scores in dogs with sodium urate-induced synovitis. *Am J Vet Res* 72(6): 757-763.
- Bustamante D, Paeile C, Willer JC, Le Bars D (1996). Effects of intravenous nonsteroidal antiinflammatory drugs on a C-fiber reflex elicited by a wide range of stimulus intensities in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 276(3): 1232-1243.
- Campoy L, Martin-Flores M, Ludders JW, Erb HN, Gleed RD (2012). Comparison of bupivacaine femoral and sciatic nerve block versus bupivacaine and morphine epidural for stifle surgery in dogs. *Vet Anaesth Analg* 39(1): 91-98.
- Carsten RE, Hellyer PW, Bachand AM, LaRue SM (2008). Correlations between acute radiation scores and pain scores in canine radiation patients with cancer of the forelimb. *Vet Anaesth Analg* 35(4): 355-362.
- Cashmore RG, Harcourt-Brown TR, Freeman PM, Jeffery ND, Granger N (2009). Clinical diagnosis and treatment of suspected neuropathic pain in three dogs. *Aust Vet J* 87(1-2): 45-50.
- Cathcart CJ, Johnston SA, Reynolds LR, Al-Nadaf S, Budsberg SC (2011). Efficacy of ABT-116, an antagonist of transient receptor potential

- vanilloid type 1, in providing analgesia for dogs with chemically induced synovitis. *Am J Vet Res* 73(1): 19-26.
- Cervero F (2009). Spinal cord hyperexcitability and its role in pain and hyperalgesia. *Exp Brain Res* 196(1): 129-137.
- Chapinal N, Fitzpatrick CE, Leslie KE, Wagner SA (2013). Short communication: Experimentally induced mastitis reduces weight shifting between the rear legs while standing in dairy cows. *J Dairy Sci* 96(5): 3039-3043.
- Chapman CR, Nakamura Y, Donaldson GW, Jacobson RC, Bradshaw DH, Flores L, Chapman CN (2001). Sensory and affective dimensions of phasic pain are indistinguishable in the self-report and psychophysiology of normal laboratory subjects. *J Pain* 2(5): 279-294.
- Choo EK, Magruder W, Montgomery CJ, Lim J, Brant R, Ansermino M (2010). Skin conductance fluctuations correlate poorly with postoperative self-reported pain measures in school-aged children. *Anesthesiology* 113: 175-182.
- Coetzee JF, Lubbers BV, Toerber SE, Gehring R, Thomson DU, White BJ, Apley MD (2008). Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. *Am J Vet Res* 69(6): 751-762.
- Cohen LL, La Greca AM, Blount RL, Kazak AE, Holmbeck GN, Lemanek KL (2008). Introduction to special issue: Evidence-based assessment in pediatric psychology. *J Pediatr Psychol* 33(9): 911-915.
- Conzemius MG, Evans RB, Besancon MF, Gordon WJ, Horstman CL, Hoefle WD, Nieves MA, Wagner SD (2005). Effect of surgical

- technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 226(2): 232-236.
- Conzemius MG, Hill CM, Sammarco JL, Perkowski SZ (1997). Correlation between subjective and objective measures used to determine severity of postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 210(11): 1619-1622.
- Cook JL, Kuroki K, Visco D, Pelletier JP, Schulz L, Lafеber FPJG (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. *Osteoarthritis Cartilage* 18(Supplement 3): S66-S79.
- Critchley HD (2002). Electrodermal responses: What happens in the brain. *Neuroscientist* 8(2): 132-142.
- Cronbach L (1951). Coefficient alpha and the internal structure of tests. *Psychometrika* 16: 297-334.
- Cronbach L, Gleser GC, Nanda H, Rajaratnam N (1972). *The Dependability of behavioral measurements: Theory of generalizability for scores and profiles*. New York, Wiley.
- Cronbach LJ, Meehl PH (1955). Construct validity in psychological tests. *Psychol Bull* 52: 281-302.
- Cronbach LJ, Shavelson RJ (2004). My current thoughts on coefficient Alpha and successor procedures. *Educ Psychol Meas* 64(3): 391-418.
- Cui Y, Xu J, Dai R, He L (2012). The interface between inhibition of descending noradrenergic pain control pathways and negative affects in post-traumatic pain patients. *Ups J Med Sci* 117(3): 293-299.

- Culp WTN, Mayhew PD, Brown DC (2009). The Effect of Laparoscopic Versus Open Ovariectomy on Postsurgical Activity in Small Dogs. *Vet Surg* 38(7): 811-817.
- Currah JM, Hendrick SH, Stookey JM (2009). The behavioral assessment and alleviation of pain associated with castration in beef calves treated with flunixin meglumine and caudal lidocaine epidural anesthesia with epinephrine. *Can Vet J* 50(4): 375-382.
- Cyplis JA, Fitzpatrick CE, Leslie KE, DeVries TJ, Haley DB, Chapinal N (2012). Short communication: The effects of experimentally induced *Escherichia coli* clinical mastitis on lying behavior of dairy cows. *J Dairy Sci* 95(5): 2571-2575.
- D'Anjou M-A, Moreau M, Troncy É, Martel-Pelletier J, Abram F, Raynauld J-P, Pelletier J-P (2008). Osteophytosis, Subchondral Bone Sclerosis, Joint Effusion and Soft Tissue Thickening in Canine Experimental Stifle Osteoarthritis: Comparison Between 1.5 T Magnetic Resonance Imaging and Computed Radiography. *Vet Surg* 37(2): 166-177.
- David PE, Nguyen H, Barbier A, Baron R (1996). The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H⁺-ATPase. *J Bone Miner Res* 11(10): 1498-1507.
- Day TK, Pepper WT, Tobias TA, Flynn MF, Clarke KM (1995). Comparison of intra-articular and epidural morphine for analgesia following stifle arthrotomy in dogs. *Vet Surg* 24(6): 522-530.
- DeCamp CE (1997). Kinetic and kinematic gait analysis and the assessment of lameness in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27(4): 825-840.

- DeRossi R, Frazílio FO, Jardim PHA, Martins ARC, Schmidt R, Negrini-Neto JM (2011). Evaluation of thoracic epidural analgesia induced by lidocaine, ketamine, or both administered via a lumbosacral approach in dogs. *Am J Vet Res* 72(12): 1580-1585.
- Devor M (2009). Ectopic discharge in A β afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 196(1): 115-128.
- Dieppe P (2011). Developments in osteoarthritis. *Rheumatology* 50(2): 245-247.
- Dixon MJ, Taylor PM, Slingsby L, Hoffmann MV, Kastner SBR, Murrell J (2010). A small, silent, low friction, linear actuator for mechanical nociceptive testing in veterinary research. *Lab Anim* 44(3): 247-253.
- Dockweiler JC, Coetzee JF, Edwards-Callaway LN, Bello NM, Glynn HD, Allen KA, Theurer ME, Jones ML, Miller KA, Bergamasco L (2013). Effect of castration method on neurohormonal and electroencephalographic stress indicators in Holstein calves of different ages. *J Dairy Sci* 96(7): 4340-4354.
- Doherty TJ, Kattesh HG, Adcock RJ, Welborn MG, Saxton AM, Morrow JL, Dailey JW (2007). Effects of a concentrated lidocaine solution on the acute phase stress response to dehorning in dairy calves. *J Dairy Sci* 90(9): 4232-4239.
- Dow C, Michel KE, Love M, Brown DC (2009). Evaluation of optimal sampling interval for activity monitoring in companion dogs. *Am J Vet Res* 70(4): 444-448.
- Drygas KA, McClure SR, Goring RL, Pozzi A, Robertson SA, Wang C (2011). Effect of cold compression therapy on postoperative pain,

swelling, range of motion, and lameness after tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *Am J Vet Med Assoc* 238(10): 1284-1291.

Duque JCM, Valadao CAA, Farias A, De Almeida RM, Oleskovicz N (2004). Pre-emptive epidural ketamine or S(+)-ketamine in post-incisional pain in dogs: a comparative study. *Vet Surg* 33(4): 361-367.

Dworkin RH, Peirce-Sandner S, Turk DC, McDermott MP, Gibofsky A, Simon LS, Farrar JT, Katz NP (2011). Outcome measures in placebo-controlled trials of osteoarthritis: Responsiveness to treatment effects in the REPORT database. *Osteoarthritis Cartilage* 19(5): 483-492.

Dworkin RH, Turk DC, Farrar JT, Haythornthwaite JA, Jensen MP, Katz NP, Kerns RD, Stucki G, Allen RR, Bellamy N, Carr DB, Chandler J, Cowan P, Dionne R, Galer BS, Hertz S, Jadad AR, Kramer LD, Manning DC, Martin S, McCormick CG, McDermott MP, McGrath P, Quessy S, Rappaport BA, Robbins W, Robinson JP, Rothman M, Royal MA, Simon L, Stauffer JW, Stein W, Tollett J, Wernicke J, Witter J (2005). Core outcome measures for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain* 113(1-2): 9-19.

Dworkin RH, Turk DC, Peirce-Sandner S, Baron R, Bellamy N, Burke LB, Chappell A, Chartier K, Cleeland CS, Costello A, Cowan P, Dimitrova R, Ellenberg S, Farrar JT, French JA, Gilron I, Hertz S, Jadad AR, Jay GW, Kalliomäki J, Katz NP, Kerns RD, Manning DC, McDermott MP, McGrath PJ, Narayana A, Porter L, Quessy S, Rappaport BA, Rauschkolb C, Reeve BB, Rhodes T, Sampaio C, Simpson DM, Stauffer JW, Stucki G, Tobias J, White RE, Witter J (2010). Research design considerations for confirmatory chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain* 149(2): 177-193.

- Dzikiti TB, Joubert KE, Venter LJ, Dzikiti LN (2006). Comparison of morphine and carprofen administered alone or in combination for analgesia in dogs undergoing ovariohysterectomy. *J S Afr Vet Assoc* 77(3): 120-126.
- Edamura K, King JN, Seewald W, Sakakibara N, Okumura M (2012). Comparison of oral robenacoxib and carprofen for the treatment of osteoarthritis in dogs: A randomized clinical trial. *J Vet Med Sci* 74(9): 1121-1131.
- Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD (1996). Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg* 82(3): 621-626.
- Farrar JT (2010). Advances in clinical research methodology for pain clinical trials. *Nat Med* 6(11): 1284-1293.
- Feldsien JD, Wilke VL, Evans RB, Conzemius MG (2010). Serum cortisol concentration and force plate analysis in the assessment of pain associated with sodium urate-induced acute synovitis in dogs. *Am J Vet Res* 71(8): 940-945.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F (2011). Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45(6): 423-429.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J (2004). Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 112(1-2): 83-93.

- Ferreira-Gomes J, Adães S, Mendonça M, Castro-Lopes JM (2012). Analgesic effects of lidocaine, morphine and diclofenac on movement-induced nociception, as assessed by the Knee-Bend and CatWalk tests in a rat model of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 101(4): 617-624.
- Firth AM, Haldane SL (1999). Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 214(5): 651-659.
- Fitzpatrick CE, Chapinal N, Petersson-Wolfe CS, DeVries TJ, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE (2013). The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. *J Dairy Sci* 96(5): 2847-2856.
- Fitzpatrick CL, Weir HL, Monnet E (2010). Effects of infiltration of the incision site with bupivacaine on postoperative pain and incisional healing in dogs undergoing ovariohysterectomy. *J Am Vet Med Assoc* 237(4): 395-401.
- Fogsgaard KK, Røntved CM, Sørensen P, Herskin MS (2012). Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 95(2): 630-638.
- Fordyce WE, Fowler RS, DeLateur B (1968). An application of behavior modification technique to a problem of chronic pain. *Behav Res Ther* 6(1): 105-107.
- Fowler D, Isakow K, Caulkett N, Waldner C (2003). An evaluation of the analgesic effects of meloxicam in addition to epidural morphine/mepivacaine in dogs undergoing cranial cruciate ligament repair. *Can Vet J* 44(8): 643-648.

- Fox SM, Mellor DJ, Lawoko CRO, Hodge H, Firth EC (1998). Changes in plasma cortisol concentrations in bitches in response to different combinations of halothane and butorphanol, with or without ovariohysterectomy. *Res Vet Sci* 65(2): 125-133.
- Fox SM, Mellor DJ, Stafford KJ, Lowoko CRO, Hodge H (2000). The effects of ovariohysterectomy plus different combinations of halothane anaesthesia and butorphanol analgesia on behaviour in the bitch. *Res Vet Sci* 68(3): 265-274.
- Freise KJ, Linton DD, Newbound GC, Tudan C, Clark TP (2012). Population pharmacokinetics of transdermal fentanyl solution following a single dose administered prior to soft tissue and orthopedic surgery in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 35: 65-72.
- Gabriel AF, Marcus MAE, Walenkamp GHIM, Joosten EAJ (2009). The CatWalk method: Assessment of mechanical allodynia in experimental chronic pain. *Behav Brain Res* 198(2): 477-480.
- Gegout-Pottie P, Philippe L, Simonin MA, Guingamp C, Gillet P, Netter P, Terlain B (1999). Biotelemetry: An original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* 48(8): 417-424.
- Gélinas C, Loiselle CG, LeMay S, Ranger M, Bouchard E, McCormack D (2008). Theoretical, Psychometric, and Pragmatic Issues in Pain Measurement. *Pain Manag Nurs* 9(3): 120-130.
- Gibson TJ, Johnson CB, Stafford KJ, Mitchinson SL, Mellor DJ (2007). Validation of the acute electroencephalographic responses of calves to noxious stimulus with scoop dehorning. *N Z Vet J* 55(4): 152-157.

- Gingerich DA, Strobel JD (2003). Use of client-specific outcome measures to assess treatment effects in geriatric, arthritic dogs: Controlled clinical evaluation of a nutraceutical. *Vet Ther* 4(4): 376-386.
- Goldring MB, Goldring SR (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213(3): 626-634.
- Goodwin LD (2002). Changing conceptions of measurement validity: An update on the new standards. *J Nurs Educ* 41(3): 100-106.
- Goranov NV (2007). Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. *Vet Clin Pathol* 36(2): 192-195.
- Graf B, Senn M (1999). Behavioural and physiological responses of calves to dehorning by heat cauterization with or without local anaesthesia. *Appl Anim Behav Sci* 62(2-3): 153-171.
- Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L (2010). Assessment of mechanisms in localized and widespread musculoskeletal pain. *Nat Rev Rheumatol* 6(10): 599-606.
- Grisneaux DE, Dupuis J, Pibarot P, Bonneau NH, Charette B, Blais D (2003). Effects of postoperative administration of ketoprofen or carprofen on short- and long-term results of femoral head and neck excision in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 223(7): 1006-1012.
- Grondahl-Nielsen C, Simonsen HB, Lund JD, Hesselholt M (1999). Behavioural, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with use of sedation and analgesia. *Vet J* 158(1): 14-20.

- Gruet P, Seewald W, King JN (2011). Evaluation of subcutaneous and oral administration of robenacoxib and meloxicam for the treatment of acute pain and inflammation associated with orthopedic surgery in dogs. *Am J Vet Res* 72(2): 184-193.
- Guillot M, Moreau M, Heit M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Troncy E (2013). Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet J* 196(3): 360-367.
- Guillot M, Rialland P, Nadeau MÈ, del Castillo JRE, Gauvin D, Troncy E (2011). Pain induced by a minor medical procedure (bone marrow aspiration) in dogs: Comparison of pain scales in a pilot study. *J Vet Intern Med* 25(5): 1050-1056.
- Guirimand F, Chauvin M, Willer JC, Le Bars D (1995). Effects of intravenous morphine and buprenorphine on a C-fiber reflex in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 273(2): 830-841.
- Gwilym SE, Keltner JR, Warnaby CE, Carr AJ, Chizh B, Chessell I, Tracey I (2009). Psychophysical and functional imaging evidence supporting the presence of central sensitization in a cohort of osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 61(9): 1226-1234.
- Haidet KK, Tate J, Divirgilio-Thomas D, Kolanowski A, Happ MB (2009). Methods to improve reliability of video-recorded behavioral data. *Res Nurs Health* 32(4): 465-474.
- Hamilton SM, Johnston SA, Broadstone RV (2005). Evaluation of analgesia provided by the administration of epidural ketamine in dogs with a chemically induced synovitis. *Vet Anaesth Analg* 32(1): 30-39.

- Hancock RB, Lanz OI, Waldron DR, Duncan RB, Broadstone RV, Hendrix PK (2005). Comparison of postoperative pain after ovariohysterectomy by harmonic scalpel-assisted laparoscopy compared with median celiotomy and ligation in dogs. *Vet Surg* 34(3): 273-282.
- Hansen BD (2003). Assessment of pain in dogs: Veterinary clinical studies. *ILAR J* 44(3): 197-205.
- Hansen BD, Hardie EM, Carroll GS (1997). Physiological measurements after ovariohysterectomy in dogs: What's normal? *Appl Anim Behav Sci* 51(1-2): 101-109.
- Hansen BD, Lascelles BDX, Keene BW, Adams AK, Thomson AE (2007). Evaluation of an accelerometer for at-home monitoring of spontaneous activity in dogs. *Am J Vet Res* 68(5): 468-475.
- Hargreaves KM, Bowles WR, Jackson DL (2003). Intrinsic regulation of CGRP release by dental pulp sympathetic fibers. *J Dent Res* 82(5): 398-401.
- Harvey V, Dickenson A (2009). Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain*. 5(1): 18.
- Hawkins P (2002). Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim* 36(4): 378-395.
- Hayes JH, Flecknell PA (1999). A comparison of pre- and post-surgical administration of bupivacaine or buprenorphine following laparotomy in the rat. *Lab Anim* 33(1): 16-23.

- Hazewinkel HA, van den Brom WE, Theijse LF, Pollmeier M, Hanson PD (2003). Reduced dosage of ketoprofen for the short-term and long-term treatment of joint pain in dogs. *Vet Rec* 152(1): 11-14.
- Hazewinkel HAW, van den Brom WE, Theyse LFH, Pollmeier M, Hanson PD (2008). Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urate crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. *Res Vet Sci* 84(1): 74-79.
- Heinrich A, Duffield TF, Lissemore KD, Millman ST (2010). The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cautery dehorning with a local anesthetic. *J Dairy Sci* 93(6): 2450-2457.
- Hellyer P, Rodan I, Brunt J, Downing R, Hagedorn JE, Robertson SA (2007). AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs & cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 43(5): 235-248.
- Hercocck CA, Pinchbeck G, Giejda A, Clegg PD, Innes JF (2009). Validation of a client-based clinical metrology instrument for the evaluation of canine elbow osteoarthritis. *J Small Anim Pract* 50(6): 266-271.
- Herr K, Bjoro K, Decker S (2006). Tools for assessment of pain in nonverbal older adults with dementia: a state-of-the-science review. *J Pain Symptom Manage* 31(2): 170-192.
- Herrero JF, Laird JMA, Lopez-Garcia JA (2000). Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: Much ado about something? *Prog Neurobiol* 61(2): 169-203.
- Herskin MS, Muller R, Schrader L, Ladewig J (2003a). A laser-based method to measure thermal nociception in dairy cows: Short-term

- repeatability and effects of power output and skin condition. *J Anim Sci* 81(4): 945-954.
- Herskin MS, Munksgaard L, Andersen JB (2007). Effects of social isolation and restraint on adrenocortical responses and hypoalgesia in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci* 85(1): 240-247.
- Herskin MS, Munksgaard L, Kristensen AM (2003b). Behavioural and adrenocortical responses of dairy cows toward novel food: Effects of food deprivation, milking frequency and energy density in the daily ration. *Appl Anim Behav Sci* 82(4): 251-265.
- Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J (2004). Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav* 83(3): 411-420.
- Hielm-Björkman AK, Kapatkin AS, Rita HJ (2011). Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dogs. *Am J Vet Res* 72(5): 601-607.
- Hielm-Björkman AK, Kuusela E, Liman A, Markkola A, Saarto E, Huttunen P, Leppaluoto J, Tulamo R-M, Raekallio M (2003). Evaluation of methods for assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222(11): 1552-1558.
- Hielm-Björkman AK, Rita H, Tulamo R-M (2009a). Psychometric testing of the Helsinki chronic pain index by completion of a questionnaire in Finnish by owners of dogs with chronic signs of pain caused by osteoarthritis. *Am J Vet Res* 70(6): 727-734.

- Hielm-Björkman AK, Tulamo R-M, Salonen H, Raekallio M (2009b). Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part I: Green-lipped Mussel (*Perna canaliculus*). *Evid Based Complement Alternat Med* 6(3): 365-673.
- Hielm-Björkman AK, Tulamo R-M, Salonen H, Raekallio M (2009c). Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part II: A Homeopathic Combination Preparation (Zeel(R)). *Evid Based Complement Alternat Med* 6(4): 465-471.
- Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, Towheed T, Welch V, Wells G, Tugwell P (2012). American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(4): 455-474.
- Hochman JR, French MR, Bermingham SL, Hawker GA (2010). The nerve of osteoarthritis pain. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62(7): 1019-1023.
- Hoelzler MG, Harvey RC, Lidbetter DA, L. MD (2005). Comparison of perioperative analgesic protocols for dogs undergoing tibial plateau leveling osteotomy. *Vet Surg* 34(4): 337-344.
- Hoelzler MG, Millis DL, Francis DA, Weigel JP (2004). Results of arthroscopic versus open arthrotomy for surgical management of cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Vet Surg* 33(2): 146-153.
- Hoffmann MV, Kastner SBR, Kietzmann M, Kramer S (2012). Contact heat thermal threshold testing in beagle dogs: Baseline reproducibility and the effect of acepromazine, levomethadone and fentanyl. *BMC Vet Res* 8(1): 206.

- Holton L, Pawson P, Nolan A, Reid J, Scott EM (2001). Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. *Vet Rec* 148(17): 525-531.
- Holton LL, Scott EM, Nolan AM, Reid J, Welsh E (1998a). Relationship between physiological factors and clinical pain in dogs scored using a numerical rating scale. *J Small Anim Pract* 39(10): 469-474.
- Holton LL, Scott EM, Nolan AM, Reid J, Welsh E, Flaherty D (1998b). Comparison of three methods used for assessment of pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 212(1): 61-66.
- Horstman CL, Conzemius MG, Evans R, Gordon WJ (2004). Assessing the efficacy of perioperative oral carprofen after cranial cruciate surgery using noninvasive, objective pressure platform gait analysis. *Vet Surg* 33(3): 286-292.
- Hrisos S, Eccles M, Francis J, Dickinson H, Kaner E, Beyer F, Johnston M (2009). Are there valid proxy measures of clinical behaviour? A systematic review. *Implement Sci* 4(1): 37.
- Hu HZ, Rusbridge C, Constantino-Casas F, Jeffery N (2012). Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide in the spinal cord of Cavalier King Charles Spaniels affected by symptomatic syringomyelia. *Res Vet Sci* 93(1): 318-320.
- Hudson JT, Slater MR, Taylor L, Scott HM, Kerwin SC (2004). Assessing repeatability and validity of a visual analogue scale questionnaire for use in assessing pain and lameness in dogs. *Am J Vet Res* 65(12): 1634-1643.

- Hullett B, Chambers N, Preuss J, Zamudio I, Lange J, Pascoe E, Ledowski T (2009). Monitoring electrical skin conductance: A tool for the assessment of postoperative pain in children? *Anesthesiology* 111(3): 513-517.
- Huxley JN, Whay HR (2006). Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *Vet Rec* 159(20): 662-668.
- Im H-J, Kim J, Li X, Kotwal N, Sumner DR, Wijnen AJv, Davis FJ, Yan D, Levine B, Henry JL, Desevré J, Kroin JS (2010). Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum* 62(10): 2995-3005.
- Imamura M, Imamura ST, Kaziyama HHS, Targino RA, Hsing WT, De Souza LPM, Cutait MM, Fregni F, Camanho GL (2008). Impact of nervous system hyperalgesia on pain, disability, and quality of life in patients with knee osteoarthritis: A controlled analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 59(10): 1424-1431.
- Imhoff DJ, Gordon-Evans WJ, Evans RB, Johnson AL, Griffon DJ, Swanson KS (2011). Evaluation of S-adenosyl l-methionine in a double-blinded, randomized, placebo-controlled, clinical trial for treatment of presumptive osteoarthritis in the dog. *Vet Surg* 40(2): 228-232.
- Inerot S, Heinegard D, Olsson SE, Telhag H, Audell L (1991). Proteoglycan alterations during developing experimental osteoarthritis in a novel hip joint model. *J Orthop Res* 9(5): 658-673.
- Ingenbleek Y, De Visscher M, De Nayer P (1972). Measurement of prealbumin as index of protein-calorie malnutrition. *Lancet* 2(7768): 106-109.

- Intema F, DeGroot J, Elshof B, Vianen ME, Yocum S, Zuurmond A, Mastbergen SC, Lafeber FP (2008). The canine bilateral groove model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 26(11): 1471-1477.
- Jaggi AS, Singh N (2011). Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Res* 1381(0): 187-201.
- Jevens DJ, Hauptman JG, DeCamp CE, Budsberg SC, Soutas-Little RW (1993). Contributions to variance in force-plate analysis of gait in dogs. *Am J Vet Res* 54(4): 612-615.
- Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Xu H, Ferng AS, Dussor G, Vanderah TW, Mantyh PW (2010). A phenotypically restricted set of primary afferent nerve fibers innervate the bone versus skin: Therapeutic opportunity for treating skeletal pain. *Bone* 46(2): 306-313.
- Johnston SA (1997). Osteoarthritis: Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27: 699-723.
- Johnston SA (2001). Overview of pain in the lame patient. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31(1): 39-53.
- Johnston SA, McLaughlin RM, Budsberg SC (2008). Nonsurgical management of osteoarthritis in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38(6): 1449-1470.
- Jourdan D, Ardid D, Eschalier A (2001). Automated behavioural analysis in animal pain studies. *Pharmacol Res* 43(2): 103-110.
- Kane MT (2001). Current concerns in validity theory. *J Educ Meas* 38(4): 319-342.

- Kania BF, Brytan M, Tomaszewska D (2009). Centrally administered verapamil prevents the autonomic reaction to visceral pain in sheep. *Res Vet Sci* 86(1): 121-128.
- Kania BF, Kania K, Romanowicz K, Tomaszewska D, Sutiak V, Wronska-Fortuna D (2006). Centrally administered PD 140.548 N-methyl-d-glucamine prevents the autonomic responses to duodenal pain in sheep. *Res Vet Sci* 81(1): 109-118.
- Kawahara S, Ueda M, Miyazaki A, Yuki U, Shono M, Horibata Y, Jono H, Obayashi K, Ikeda K, Tanase S, Ando Y (2011). Age-dependent increase in thiol conjugated forms of transthyretin (TTR) in the elderly: Quantitative analyses by the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) protein chip system. *Amyloid* 18(Suppl. 1): 14-16.
- Kemp MH, Nolan AM, Cripps PJ, Fitzpatrick JL (2008). Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. *Vet Rec* 163(6): 175-179.
- Kobayashi S, Baba H, Uchida K, Kokubo Y, Kubota C, Yamada S, Suzuki Y, Yoshizawa H (2005). Effect of mechanical compression on the lumbar nerve root: Localization and changes of intradiscal inflammatory cytokines, nitric oxide, and cyclooxygenase. *Spine* 30(15): 1699-1705.
- Kona-Boun J-J, Cuvellez S, Troncy E (2006). Evaluation of epidural administration of morphine or morphine and bupivacaine for postoperative analgesia after premedication with an opioid analgesic and orthopedic surgery in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 229(7): 1103-1112.

- Kongara K, Chambers JP, Johnson CB (2010). Electroencephalographic responses of tramadol, parecoxib and morphine to acute noxious electrical stimulation in anaesthetised dogs. *Res Vet Sci* 88(1): 127-133.
- Kongara K, Chambers JP, Johnson CB (2011). Effects of tramadol, morphine or their combination in dogs undergoing ovariohysterectomy on peri-operative electroencephalographic responses and post-operative pain. *N Z Vet J* 60(2): 129-135.
- Kongara K, Chambers JP, Johnson CB, Dukkupati VS (2013). Effects of tramadol or morphine in dogs undergoing castration on intra-operative electroencephalogram responses and post-operative pain. *N Z Vet J*: 1-5.
- Kosek E, Ordeberg G (2000a). Abnormalities of somatosensory perception in patients with painful osteoarthritis normalize following successful treatment. *Eur J Pain* 4: v.
- Kosek E, Ordeberg G (2000b). Lack of pressure pain modulation by heterotopic noxious conditioning stimulation in patients with painful osteoarthritis before, but not following, surgical pain relief. *Pain* 88(1): 69-78.
- Krohn CC (1994). Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. 3. Grooming, exploration and abnormal-behavior. *Appl Anim Behav Sci* 42: 73–86.
- Krohn CC, Munksgaard L (1993). Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. 2. Lying and lying-down behaviour. *Appl Anim Behav Sci* 37: 1-16.

- KuKanich B, Lascelles BDX, Papich MG (2005). Assessment of a von Frey device for evaluation of the antinociceptive effects of morphine and its application in pharmacodynamic modeling of morphine in dogs. *Am J Vet Res* 66(9): 1616-1622.
- KuKanich B, Papich MG (2011). Pharmacokinetics and antinociceptive effects of oral tramadol hydrochloride administration in Greyhounds. *Am J Vet Res* 72(2): 256-262.
- Kuroki K, Cook CR, Cook JL (2011). Subchondral bone changes in three different canine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19(9): 1142-1149.
- Kyles AE, Hardie EM, Hansen BD, Papich MG (1998). Comparison of transdermal fentanyl and intramuscular oxymorphone on post-operative behaviour after ovariohysterectomy in dogs. *Res Vet Sci* 65(3): 245-251.
- Laboissière B (2006). Statistical validation of 4A-VET'S postoperative pain scale in dogs and cats. Nantes, École Nationale Vétérinaire de Nantes. **Thesis:** 229.
- Laboissière B. (2006). Statistical validation of 4A-VET'S postoperative pain scale in dogs and cats. Nantes, École Nationale Vétérinaire de Nantes. **Thesis:** 229.
- Lafuente MP, Franch J, Durall I, Diaz-Bertrana MC, Marquez RM (2005). Comparison between meloxicam and transdermally administered fentanyl for treatment of postoperative pain in dogs undergoing osteotomy of the tibia and fibula and placement of a uniplanar external distraction device. *J Am Vet Med Assoc* 227(11): 1768-1774.

- Laim A, Jaggy A, Forterre F, Doherr MG, Aeschbacher G, Glardon O (2009). Effects of adjunct electroacupuncture on severity of postoperative pain in dogs undergoing hemilaminectomy because of acute thoracolumbar intervertebral disk disease. *J Am Vet Med Assoc* 234(9): 1141-1146.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingraio J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7(6): 447-449.
- Laredo FG, Belda E, Murciano J, Escobar M, Navarro A, Robinson KJ, Jones RS (2004). Comparison of the analgesic effects of meloxicam and carprofen administered preoperatively to dogs undergoing orthopaedic surgery. *Vet Rec* 155(21): 667-671.
- Lascelles BDX, Bernie DH, Simon R, Venita D, Andrea T, Courtney CP, Eric SS, Elizabeth R (2007). Evaluation of Client-Specific Outcome Measures and activity monitoring to measure pain relief in cats with osteoarthritis. *J Vet Intern Med* 21(3): 410-416.
- Lascelles BDX, Cripps PJ, Jones A, Waterman AE (1997). Post-operative central hypersensitivity and pain: The pre-emptive value of pethidine for ovariohysterectomy. *Pain* 73(3): 461-471.
- Lascelles BDX, Gaynor JS, Smith ES, Roe SC, Marcellin-Little DJ, Davidson G, Boland E, Carr J (2008). Amantadine in a multimodal analgesic regimen for alleviation of refractory osteoarthritis pain in dogs. *J Vet Intern Med* 22(1): 53-59.

- Latremolière A, Woolf CJ (2009). Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10(9): 895-926.
- Laven RA, Huxley JN, Whay HR, Stafford KJ (2009). Results of a survey of attitudes of dairy veterinarians in New Zealand regarding painful procedures and conditions in cattle. *N Z Vet J* 57(4): 215-220.
- Laven RA, Lawrence KE, Weston JF, Dowson KR, Stafford KJ (2008). Assessment of the duration of the pain response associated with lameness in dairy cows, and the influence of treatment. *N Z Vet J* 56(5): 210-217.
- Lay DC, Friend TH, Randel RD, Jenkins OC, Neuendorff DA, Kapp GM, Bushong DM (1996). Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. *J Anim Sci* 74(8): 1806-1811.
- Lay DC, Jr., Friend TH, Bowers CL, Grissom KK, Jenkins OC (1992). A comparative physiological and behavioral study of freeze and hot-iron branding using dairy cows. *J Anim Sci* 70(4): 1121-1125.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53(4): 597-652.
- Leach MC, Klaus K, Miller AL, Scotto di Perrotolo M, Sotocinal SG, Flecknell PA (2012). The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 7(4): e35656.
- Ledowski T, Bromilow J, Paech MJ, Storm H, Hacking R, Schug SA (2006). Monitoring of skin conductance to assess postoperative pain intensity. *Br J Anaesth* 97(6): 862-865.

- Leibetseder EN, Mosing M, Jones RS (2006). A comparison of extradural and intravenous methadone on intraoperative isoflurane and postoperative analgesia requirements in dogs. *Vet Anaesth Analg* 33(2): 128-136.
- Lester SJ, Mellor DJ, Holmes RJ, Ward RN, Stafford KJ (1996). Behavioural and cortisol responses of lambs to castration and tailing using different methods. *N Z Vet J* 44(2): 45-54.
- Ley S, Waterman A, Livingston A (1991). The influence of chronic pain on the analgesic effects of the alpha 2-adrenoceptor agonist, xylazine, in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 14(2): 141-144.
- Li X, Kim J-S, van Wijnen A, Im H-J (2011). Osteoarthritic tissues modulate functional properties of sensory neurons associated with symptomatic OA pain. *Mol Biol Rep* 38(8): 5335-5339.
- Libicher M, Ivancic M, Hoffmann M, Wenz W (2005). Early changes in experimental osteoarthritis using the Pond-Nuki dog model: Technical procedure and initial results of in vivo MR imaging. *Eur Radiol* 15(2): 390-394.
- Lindhorst E, Vail TP, Guilak F, Wang H, Setton LA, Vilim V, Kraus VB (2000). Longitudinal characterization of synovial fluid biomarkers in the canine meniscectomy model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 18(2): 269-280.
- Lipscomb VJ, Peard MJ, Muir P, AliAbadi FS, Lees P (2002). Clinical efficacy and pharmacokinetics of carprofen in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 150(22): 684-689.
- Little CB, Hunter DJ (2013). Post-traumatic osteoarthritis: From mouse models to clinical trials. *Nat Rev Rheumatol* 9(8): 485-497.

- Loeffler K (1986). Assessing pain by studying posture, activity and function. in Proceedings. Workshop Assess Pain Farm Anim: 49-57.
- Loeser RF (2006). Molecular mechanisms of cartilage destruction: Mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 54(5): 1357-1360.
- Loggia ML, Juneau M, Bushnell MC (2011). Autonomic responses to heat pain: Heart rate, skin conductance, and their relation to verbal ratings and stimulus intensity. *Pain* 152(3): 592-598.
- Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W (2005). Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 7(1): R156-R165.
- Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, Keyser CP, Clohisy DR, Adams DJ, O'Leary P, Mantyh PW (2002). Origins of skeletal pain: Sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* 113(1): 155-166.
- Machado Filho LC, Hurnik JF, Ewing KK (1998). A thermal threshold assay to measure the nociceptive response to morphine sulphate in cattle. *Can J Vet Res* 62(3): 218-223.
- Malek S, Sample S, Schwartz Z, Nemke B, Jacobson P, Cozzi E, Schaefer S, Bleedorn J, Holzman G, Muir P (2012). Effect of analgesic therapy on clinical outcome measures in a randomized controlled trial using client-owned dogs with hip osteoarthritis. *BMC Vet Res* 8(1): 185.

- Mansour AR, Farmer MA, Baliki MN, Apkarian AV (2014). Chronic pain: The role of learning and brain plasticity. *Restor Neurol Neurosci* 32(1): 129-139.
- Marshall W, Hazewinkel H, Mullen D, De Meyer G, Baert K, Carmichael S (2010). The effect of weight loss on lameness in obese dogs with osteoarthritis. *Vet Res Commun* 34(3): 241-253.
- Martin P, Bateson P (2007). *Measuring behaviour: An introductory guide*. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, van Roermund PM, Bijlsma JW, Lafeber FP (2006). The canine 'groove' model of osteoarthritis is more than simply the expression of surgically applied damage. *Osteoarthritis Cartilage* 14(1): 39-46.
- Mathews KA (2000). Pain assessment and general approach to management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30(4): 729-755.
- McCarthy G, O'Donovan J, Jones B, McAllister H, Seed M, Mooney C (2007). Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J* 174(1): 54-61.
- McDougall JJ (2006). Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther* 8(6): 220.
- McMeekan C, Stafford KJ, Mellor DJ, Bruce RA, Ward RN, Gregory NG (1999). Effects of a local anaesthetic and a non-steroidal anti-inflammatory analgesic on the behavioural responses of calves to dehorning. *N Z Vet J* 47(3): 92-96.

- Medrano-Galarza C, Gibbons J, Wagner S, de Passillé AM, Rushen J (2012). Behavioral changes in dairy cows with mastitis. *J Dairy Sci* 95(12): 6994-7002.
- Mellor DJ, Stafford KJ (1997). Interpretation of cortisol responses in calf disbudding studies. *N Z Vet J* 45(3): 126-127.
- Mellor DJ, Stafford KJ, Todd SE, Lowe TE, Gregory NG, Bruce RA, Ward RN (2002). A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust Vet J* 80(4): 228-233.
- Melzack R (1975). The McGill Pain Questionnaire: Major properties and scoring methods. *Pain* 1: 277-299.
- Melzack R, Casey KL (1968). Sensory, motivational and central control determinants of chronic pain: a new conceptual model. The Skin Senses. Kenshalo D. Springfield, Illinois, Thomas: 423-443.
- Melzack R, Torgerson W (1971). On the language of pain. *Anesthesiology* 34: 50 - 59.
- Melzack R, Wall P (1965). Pain mechanisms: A new theory. *Science* 150(699): 971-979.
- Messick S (1989). Validity. Educational measurement. Linn RL. New York, Macmillan: 13-103.
- Mialon MM, Deiss V, Andanson S, Anglard F, Doreau M, Veissier I (2012). An assessment of the impact of rumenocentesis on pain and stress in cattle and the effect of local anaesthesia. *Vet J* 194(1): 55-59.

- Michel KE, Brown DC (2011). Determination and application of cut points for accelerometer-based activity counts of activities with differing intensity in pet dogs. *Am J Vet Res* 72(7): 866-870.
- Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6): 355-474.
- Mintline EM, Stewart M, Rogers AR, Cox NR, Verkerk GA, Stookey JM, Webster JR, Tucker CB (2013). Play behavior as an indicator of animal welfare: Disbudding in dairy calves. *Appl Anim Behav Sci* 144(1-2): 22-30.
- Moak P, Hosgood G, Rowe E, Lemke KA (2011). Evaluation of intra-articular and subcutaneous administration of meloxicam for postoperative analgesia following stifle surgery in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 24(1): 32-38.
- Mogil JS (2009). Animal models of pain: Progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10(4): 283-294.
- Mogil JS, Graham AC, Ritchie J, Hughes SF, Austin JS, Schorscher-Petcu A, Langford DJ, Bennett GJ (2010). Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Mol Pain* 6: 34.
- Moll X, Fresno L, Garcia F, Prandi D, Andaluz A (2011). Comparison of subcutaneous and transdermal administration of buprenorphine for pre-emptive analgesia in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *Vet J* 187(1): 124-128.

- Molony V, Kent JE (1997). Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 75(1): 266-272.
- Molony V, Kent JE, McKendrick IJ (2002). Validation of a method for assessment of an acute pain in lambs. *Appl Anim Behav Sci* 76(3): 215-238.
- Molony V, Kent JE, Robertson IS (1995). Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. *Appl Anim Behav Sci* 46(1-2): 33-48.
- Monkkonen J, Simila J, Rogers MJ (1998). Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci* 62(8): PL95-102.
- Moore SA, Hettlich BF, Waln A (2013). The use of an electronic von Frey device for evaluation of sensory threshold in neurologically normal dogs and those with acute spinal cord injury. *Vet J* 197(2): 216-219.
- Moreau M, Dupuis J, Bonneau NH, Desnoyers M (2003). Clinical evaluation of a nutraceutical, carprofen and meloxicam for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 152(11): 323-329.
- Moreau M, Dupuis J, Bonneau NH, Lecuyer M (2004). Clinical evaluation of a powder of quality elk velvet antler for the treatment of osteoarthrosis in dogs. *Can Vet J* 45(2): 133-139.
- Moreau M, Lussier B, Doucet M, Vincent G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2007). Efficacy of licofelone in dogs with clinical osteoarthritis. *Vet Rec* 160(17): 584-588.

- Moreau M, Lussier B, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Bedard C, Gauvin D, Troncy E (2012). *BrachySTEMMA calycinum* D. Don effectively reduces the locomotor disability in dogs with naturally occurring osteoarthritis: A randomized placebo-controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 646191.
- Moreau M, Pelletier J-P, Lussier B, d'Anjou M-A, Blond L, Pelletier J-M, del Castillo JRE, Troncy e (2013). A posteriori comparison of natural and surgical destabilization models of canine osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013: Article ID 180453.
- Moreau M, Rialland P, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, Caron J, Frank D, Lussier B, del Castillo JRE, Beauchamp G, Gauvin D, Bertaim T, Thibaud D, Troncy E (2011). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 13(3): R98.
- Moreau M, Troncy E, Bichot S, Lussier B (2010). Influence of changes in body weight on peak vertical force in osteoarthritic dogs: A possible bias in study outcome. *Vet Surg* 39(1): 43-47.
- Morgaz J, Navarrete R, Muñoz-Rascón P, Domínguez JM, Fernández-Sarmiento JA, Gómez-Villamandos RJ, Granados MM (2013). Postoperative analgesic effects of dexketoprofen, buprenorphine and tramadol in dogs undergoing ovariohysterectomy. *Res Vet Sci* 95(1): 278-282.
- Morton CM, Reid J, Scott EM, Holton LL, Nolan AM (2005). Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale

- for assessment of acute pain in dogs. *Am J Vet Res* 66(12): 2154-2166.
- Morton DB, Griffiths PH (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 116(16): 431-436.
- Muir WW, 3rd, Wiese AJ, Wittum TE (2004). Prevalence and characteristics of pain in dogs and cats examined as outpatients at a veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc* 224(9): 1459-1463.
- Murrell JC, Psatha EP, Scott EM, Reid J, Hellebrekers LJ (2008). Application of a modified form of the Glasgow pain scale in a veterinary teaching centre in the Netherlands. *vet Rec* 162(13): 403-408.
- Myers SL, Brandt KD, Eilam O (1995). Even low-grade synovitis significantly accelerates the clearance of protein from the canine knee. Implications for measurement of synovial fluid "markers" of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 38(8): 1085-1091.
- Neugebauer V, Li W (2002). Processing of nociceptive mechanical and thermal information in central amygdala neurons with knee-joint input. *J Neurophysiol* 87(1): 103-112.
- Newby NC, Pearl DL, LeBlanc SJ, Leslie KE, von Keyserlingk MAG, Duffield TF (2013). The effect of administering ketoprofen on the physiology and behavior of dairy cows following surgery to correct a left displaced abomasum. *J Dairy Sci* 96(3): 1511-1520.
- Nolan A, Livingston A, Morris R, Waterman A (1987). Techniques for comparison of thermal and mechanical nociceptive stimuli in the sheep. *J Pharmacol Methods*. 17(1): 39-49.

- Norman GR, Stratford P, Regehr G (1997). Methodological problems in the retrospective computation of responsiveness to change: The lesson of Cronbach. *J Clin Epidemiol* 50: 869-879.
- Novy DM, Nelson DV, Francis DJ, Turk DC (1995). Perspectives of chronic pain: An evaluative comparison of restrictive and comprehensive models. *Psychol Bull* 118(2): 238-247.
- Nunes AF, Saraiva MJ, Sousa MM (2006). Transthyretin knockouts are a new mouse model for increased neuropeptide Y. *FASEB J* 20(1): 166-168.
- Nunnally JC, Bernstein IH (1994). *Psychometric theory*. New York, McGraw-Hill.
- O'Connor BL, Visco DM, Rogers PI, Mamlin LA, Brandt KD (1999). Serial force plate analyses of dogs with unilateral knee instability, with or without interruption of the sensory input from the ipsilateral limb. *Osteoarthritis and Cartilage* 7(6): 567-573.
- Ogunshina SO, Hussain MA (1980). Plasma thyroxine binding prealbumin as an index of mild protein-energy malnutrition in Nigerian children. *Am J Clin Nutr* 33(4): 794-800.
- Okuda-Ashitaka E, Ito S (2000). Nocistatin: A novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides* 21(7): 1101-1109.
- Oosterlinck M, Bosmans T, Gasthuys F, Polis I, Van Ryssen B, Dewulf J, Pille F (2011). Accuracy of pressure plate kinetic asymmetry indices and their correlation with visual gait assessment scores in lame and non lame dogs. *Am J Vet Res* 72(6): 820-825.

- Orendáčová J, Maršala M, Šulla I, Kafka J, Jalč P, čižková D, Taira Y, Maršala J (1999). Incipient cauda equina syndrome as a model of somatovisceral pain in dogs: Spinal cord structures involved as revealed by the expression of c-fos and NADPH diaphorase activity. *Neuroscience* 95(2): 543-557.
- Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Inoue G, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Toyone T, Aoki Y, Kubo T, Takahashi K, Ohtori S (2011). Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord* 12(1): 134.
- Panula HE, Helminen HJ, Kiviranta I (1997). Slowly progressive osteoarthritis after tibial valgus osteotomy in young beagle dogs. *Clin Orthop Relat Res*(343): 192-202.
- Patterson JC, Ungerleider LG, Bandettini PA (2002). Task-dependent functional brain activity correlation with skin conductance changes: An fMRI study. *Neuroimage* 1797–1806.
- Pedersen LH, Blackburn-Munro G (2006). Pharmacological characterisation of place escape/avoidance behaviour in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology* 185(2): 208-217.
- Peeters ME, Kirpensteijn J (2011). Comparison of surgical variables and short-term postoperative complications in healthy dogs undergoing ovariohysterectomy or ovariectomy. *J Am Vet Med Assoc* 238(2): 189-194.

- Pelligrino DA, Laurito CE, VadeBoncouer TR (1996). Nitric oxide synthase inhibition modulates the ventilatory depressant and antinociceptive actions of fourth ventricular infusions of morphine in the awake dog. *Anesthesiology* 85(6): 1367-1377.
- Pertovaara A (2006). Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 80(2): 53-83.
- Petrie NJ, Mellor DJ, Stafford KJ, Bruce RA, Ward RN (1996). Cortisol responses of calves to two methods of tail docking used with or without local anaesthetic. *N Z Vet J* 44: 4-8.
- Pibarot P, Dupuis J, Grisneaux E, Cuvelliez S, Planté J, Beauregard G, Bonneau N, Bouffard J, Blais D (1997). Comparison of ketoprofen, oxymorphone hydrochloride, and butorphanol in the treatment of postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 211(4): 438-444.
- Piesla MJ, Leventhal L, Strassle BW, Harrison JE, Cummons TA, Lu PM, Whiteside GT (2009). Abnormal gait, due to inflammation but not nerve injury, reflects enhanced nociception in preclinical pain models. *Brain Res* 1295: 89-98.
- Pollmeier M, Toulemonde C, Fleishman C, Hanson PD (2006). Clinical evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 159(17): 547-551.
- Pond MJ, Nuki G (1973). Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32(4): 387-388.
- Poole R, Blake S, Buschmann M, Goldring S, Lavery S, Lockwood S, Matyas J, McDougall J, Pritzker K, Rudolph K, van den Berg W, Yaksh T (2010). Recommendations for the use of preclinical models

in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18(Supplement 3): S10-S16.

Preston T, Baltzer W, Trost S (2012). Accelerometer validity and placement for detection of changes in physical activity in dogs under controlled conditions on a treadmill. *Res Vet Sci* 3(1): 412-416.

Punke JP, Speas AL, Reynolds LR, Claxton RF, Budsberg SC (2007). Kinetic gait and subjective analysis of the effects of a tachykinin receptor antagonist in dogs with sodium urate-induced synovitis. *Am J Vet Res* 68(7): 704-708.

Puskás LG, Kitajka K, Nyakas C, Barcelo-Coblijn G, Farkas T (2003). Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4): 1580-1585.

Quinn MM, Keuler NS, Lu Y, Faria ML, Muir P, Markel MD (2007). Evaluation of agreement between numerical rating scales, visual analogue scoring scales, and force plate gait analysis in dogs. *Vet Surg* 36(4): 360-367.

Rasmussen D, Fogsgaard K, Rontved C, Klaas I, Herskin M (2011). Changes in thermal nociceptive responses in dairy cows following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet Scand* 53(1): 32.

Rasmussen LM, Lipowitz AJ, Graham LF (2006). Controlled, clinical trial assessing saphenous, tibial and common peroneal nerve blocks for the control of perioperative pain following femoro-tibial joint surgery in the nonchondrodystrophoid dog. *Vet Anaesth Analg* 33(1): 49-61.

- Reese CJ, Trotter EJ, Short CE, Erb HN, Barlow LL (2000). Assessing the efficacy of perioperative carprofen administration in dogs undergoing surgical repair of a ruptured cranial cruciate ligament. *J Am Anim Hosp Assoc* 36(5): 448-455.
- Reid J, Nolan AM, Hughes JML, Lascelles D, Pawson P, Scott EM (2007). Development of the short-form Glasgow composite measure pain scale (CMPS-SF) and derivation of an analgesic intervention score. *Anim Welf* 16: 97-104.
- Rialland P, Bichot S, Lussier B, Moreau M, Beaudry F, del Castillo JRE, Gauvin D, Troncy E (2012). Effect of a green-lipped mussel-enriched diet on pain behaviours and functioning in dogs with clinical osteoarthritis *Can Vet J* 77(1): 66-74.
- Rialland P, Bichot S, Lussier B, Moreau M, Beaudry F, del Castillo JrmRE, Gauvin D, Troncy E (2013). Effect of a diet enriched with green-lipped mussel on pain behavior and functioning in dogs with clinical osteoarthritis. *Can J Vet Res* 77(1): 66-74.
- Rice ASC, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, Mogil JS, Stöhr T (2008). Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: A critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 139(2): 243-247.
- Richardson CA, Niel L, Leach MC, Flecknell PA (2007). Evaluation of the efficacy of a novel electronic pain assessment device, the Pain Gauge, for measuring postoperative pain in rats. *Lab Anim* 41(1): 46-54.

- Robért BD, White BJ, Renter DG, Larson RL (2011). Determination of lying behavior patterns in healthy beef cattle by use of wireless accelerometers. *Am J Vet Res* 72(4): 467-473.
- Roughan JV, Flecknell PA (2000). Effects of surgery and analgesic administration on spontaneous behaviour in singly housed rats. *Res Vet Sci* 69(3): 283-288.
- Roughan JV, Flecknell PA (2001). Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90(1-2): 65-74.
- Roughan JV, Flecknell PA (2004). Behaviour-based assessment of the duration of laparotomy-induced abdominal pain and the analgesic effects of carprofen and buprenorphine in rats. *Behav Pharmacol* 15(7): 461-472.
- Roush JK, Cross AR, Renberg WC, Dodd CE, Sixby KA, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA (2010). Evaluation of the effects of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on weight bearing in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 236(1): 67-73.
- Rouwette T, Vanelderden P, de Reus M, Loohuis NO, Giele J, van Egmond J, Scheenen W, Scheffer GJ, Roubos E, Vissers K, Kozicz T (2012). Experimental neuropathy increases limbic forebrain CRF. *Eur J Pain* 16(1): 61-71.
- Rusbridge C, Carruthers H, Dubé MP, Holmes M, Jeffery ND (2007). Syringomyelia in cavalier King Charles spaniels: The relationship between syrinx dimensions and pain. *J Small Anim Pract* 48(8): 432-436.

- Rushen J, Boissy A, Terlouw EM, de Passille AM (1999). Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. *J Anim Sci* 77(11): 2918-2924.
- Rutherford KM (2002). Assessing pain in animals. *Anim Welf* 11(1): 31-53.
- Rutten K, Vry JD, Robens A, Tzschentke TM, van der Kam EL (2011). Dissociation of rewarding, anti-aversive and anti-nociceptive effects of different classes of anti-nociceptives in the rat. *Eur J Pain* 15(3): 299-305.
- Saadé NE, Jabbur SJ (2008). Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: Spinal and supraspinal mechanisms. *Prog Neurobiol* 86(1): 22-47.
- Sagar D, Burston J, Hathway G, Woodhams S, Pearson R, Bennett A, Kendall D, Scammell B, Chapman V (2011). The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 7(1): 88.
- Sammarco JL, Conzemius MG, Perkowski SZ, Weinstein MJ, Gregor TP, Smith GK (1996). Postoperative analgesia for stifle surgery: A comparison of intra-articular bupivacaine, morphine, or saline. *Vet Surg* 25(1): 59-69.
- Sanderson RO, Beata C, Flipo RM, Genevois JP, Macias C, Tacke S, Vezzoni A, Innes JF (2009). Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet Rec* 164(14): 418-424.
- Sandkühler J (2007). Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3(1): 9.
- Sanford J, Ewbank R, V M (1985). Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. *Vet Rec* 118: 334–338.

- Sarrau S, Jourdan J, Dupuis-Soyris F, Verwaerde P (2007). Effects of postoperative ketamine infusion on pain control and feeding behaviour in bitches undergoing mastectomy. *J Small Anim Pract* 48(12): 670-676.
- Schaible H-G, Banchet GSv, Boettger MK, Bräuer R, Gajda M, Richter F, Hensellek S, Brenn D, Natura G (2010). The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci* 1193: 60-69.
- Schaible H-G, Richter F, Ebersberger A, Boettger M, Vanegas H, Natura G, Vazquez E, Segond von Banchet G (2009). Joint pain. *Exp Brain Res* 196(1): 153-162.
- Schaible H-G, Schmelz M, Tegeder I (2006). Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58(2): 323-342.
- Schaible HG, Jarrott B, Hope PJ, Duggan AW (1990). Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: A study with antibody microprobes. *Brain Res* 529(1-2): 214-223.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15(1 Pt 1): 333-341.
- Schuelert N, McDougall J (2012). Involvement of Nav 1.8 sodium ion channels in the transduction of mechanical pain in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 14(1): R5.
- Schuelert N, McDougall JJ (2009). Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization

- of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett* 465(2): 184-188.
- Schulz KL, Anderson DE, Coetzee JF, White BJ, Miesner MD (2011). Effect of flunixin meglumine on the amelioration of lameness in dairy steers with amphotericin B-induced transient synovitis-arthritis. *Am J Vet Res* 72(11): 1431-1438.
- Schumacher H, Phelps P, Agudelo C (1974). Urate crystal induced inflammation in dog joints: Sequence of synovial changes. *J Rheumatol* 1: 102-113.
- Schwartzkopf-Genswein KS, Stookey JM, Crowe TG, Genswein BM (1998). Comparison of image analysis, exertion force, and behavior measurements for use in the assessment of beef cattle responses to hot-iron and freeze branding. *J Anim Sci* 76(4): 972-979.
- Sengupta JN (2009). Visceral pain: The neurophysiological mechanism. *Handb Exp Pharmacol* 194: 31-74.
- Seybold VS (2009). The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol* 194: 451-491.
- Sharp TJ (2001). Chronic pain: A reformulation of the cognitive-behavioural model. *Behav Res Ther* 39(7): 787-800.
- Shavit Y, Fish G, Wolf G, Mayburd E, Meerson Y, Yirmiya R, Beilin B (2005). The effects of perioperative pain management techniques on food consumption and body weight after laparotomy in rats. *Anesth Analg* 101(4): 1112-1116.
- Shih AC, Robertson S, Isaza N, Pablo L, Davies W (2008). Comparison between analgesic effects of buprenorphine, carprofen, and

- buprenorphine with carprofen for canine ovariohysterectomy. *Vet Anaesth Analg* 35(1): 69-79.
- Short CE (1998). Fundamentals of pain perception in animals. *Appl Anim Behav Sci* 59(1/3): 125-133.
- Siivonen J, Taponen S, Hovinen M, Pastell M, Lensink BJ, Pyörälä S, Hänninen L (2011). Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Appl Anim Behav Sci* 132(3-4): 101-106.
- Slingsby LS, Taylor PM, Murrell JC (2011). A study to evaluate buprenorphine at 40 µg kg⁻¹ compared to 20 µg kg⁻¹ as a post-operative analgesic in the dog. *Vet Anaesth Analg* 38(6): 584-593.
- Slingsby LS, Taylor PM, Waterman-Pearson AE (2006). Effects of two doses of buprenorphine four or six hours apart on nociceptive thresholds, pain and sedation in dogs after castration. *Vet Rec* 159(21): 705-711.
- Stafford K (2007). Alleviating the pain caused by the castration of cattle. *Vet J* 173(2): 245-247.
- Stafford K, Mellor D (1993). Castration, tail docking and dehorning-what are the constraints? . *Proc N Z Soc Anim Prod* 189-195.
- Stafford KJ, Mellor DJ (2005). Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *Vet J* 169(3): 337-349.
- Stafford KJ, Mellor DJ, Todd SE, Ward RN, McMeekan CM (2003). The effect of different combinations of lignocaine, ketoprofen, xylazine and tolazoline on the acute cortisol response to dehorning in calves. *N Z Vet J* 51(5): 219-226.
- Staton PC, Wilson AW, Bountra C, Chessell IP, Day NC (2007). Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory

- model of the rat knee joint: Differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *Eur J Pain* 11(3): 283-289.
- Stephenson DT, Arneric SP (2008). Neuroimaging of pain: Advances and future prospects. *J Pain* 9(7): 567-579.
- Stevens B, Gibbins S (2002). Clinical utility and clinical significance in the assessment and management of pain in vulnerable infants. *Clin Perinatol* 29(3): 459-468.
- Stewart M, Stafford KJ, Dowling SK, Schaefer AL, Webster JR (2008). Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. *Physiol Behav* 93(4-5): 789-797.
- Stewart M, Verkerk GA, Stafford KJ, Schaefer AL, Webster JR (2010). Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. *J Dairy Sci* 93(8): 3602-3609.
- Stewart M, Webster JR, Verkerk GA, Schaefer AL, Colyn JJ, Stafford KJ (2007). Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography. *Physiol Behav* 92(3): 520-525.
- Stilwell G, Carvalho RC, Carolino N, Lima MS, Broom DM (2010). Effect of hot-iron disbudding on behaviour and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. *Res Vet Sci* 88(1): 188-193.
- Storm H (2000). Skin conductance and the stress response from heel stick in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 83(2): F143-F147.
- Storm H (2008). Changes in skin conductance as a tool to monitor nociceptive stimulation and pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 21(6): 796-804.

- Storm H, Myre K, Rostrup M, Stokland O, Lien MD, Ræder JC (2002). Skin conductance correlates with perioperative stress. *Acta Anaesthesiol Scand* 46(7): 887-895.
- Storm H, Shafiei M, Myre K, Ræder J (2005). Palmar skin conductance compared to a developed stress score and to noxious and awakening stimuli on patients in anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 49(6): 798-803.
- Streiner DL, Norman GR (2003). *Health measurement scales: A practical guide to their development and use*. New York, Oxford University Press.
- Streiner DL, Norman GR (2008). *Health measurement scales: A practical guide to their development and use*. New York, Oxford University Press.
- Süer C, Özesm C, Temoçn S, Doğan P, Iliv G (1992). The effects of immobilization stress on electrodermal activity and brain catecholamine levels in rats. *Int J Neurosci* 65(1-4): 91-101.
- Sutherland MA, Mellor DJ, Stafford KJ, Gregory NG, Bruce RA, Ward RN (2002). Cortisol responses to dehorning of calves given a 5-h local anaesthetic regimen plus phenylbutazone, ketoprofen, or adrenocorticotrophic hormone prior to dehorning. *Res Vet Sci* 73(2): 115-123.
- Sylvester SP, Stafford KJ, Mellor DJ, Bruce RA, Ward RN (1998). Acute cortisol responses of calves to four methods of dehorning by amputation. *Aust Vet J* 76(2): 123-126.

- Sylvester SP, Stafford KJ, Mellor DJ, Bruce RA, Ward RN (2004). Behavioural responses of calves to amputation dehorning with and without local anaesthesia. *Aust Vet J* 82(11): 697-700.
- Tadich N, Tejada C, Bastias S, Rosenfeld C, Green LE (2013). Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. *Vet J* 197(2): 401-405.
- Tashman S, Anderst W, Kolowich P, Havstad S, Arnoczky S (2004). Kinematics of the ACL-deficient canine knee during gait: Serial changes over two years. *J Orthop Res* 22(5): 931-941.
- Thakur M, Rahman W, Hobbs C, Dickenson AH, Bennett DLH (2012). Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One* 7(3): e33730.
- Theurer ME, White BJ, Coetzee JF, Edwards LN, Mosher RA, Cull CA (2012). Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. *BMC Vet Res* 8(48).
- Thompson L, Boudreau R, Newman A, Hannon M, Chu C, Nevitt M (2010). The association of osteoarthritis risk factors with localized, regional and diffuse knee pain. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1244-1249.
- Thuer S, Mellema S, Doherr MG, Wechsler B, Nuss K, Steiner A (2007). Effect of local anaesthesia on short- and long-term pain induced by two bloodless castration methods in calves. *Vet J* 173(2): 333-342.
- Ting ST, Earley B, Crowe MA (2003). Effect of repeated ketoprofen administration during surgical castration of bulls on cortisol,

- immunological function, feed intake, growth, and behavior. *J Anim Sci* 81(5): 1253-1264.
- Ting STL, Earley B, Veissier I, Gupta S, Crowe MA (2010). Effects of Burdizzo castration on CO₂ laser induced thermal nociception of Holstein–Friesian calves of different ages. *Appl Anim Behav Sci* 126(1-2): 12-18.
- Tom EM, Duncan IJH, Widowski TM, Bateman KG, Leslie KE (2002). Effects of tail docking using a rubber ring with or without anesthetic on behavior and production of lactating cows. *J Dairy Sci* 85(9): 2257-2265.
- Toutain PL, Cester CC, Haak T, Laroute V (2001). A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach vs. a dose titration for the determination of a dosage regimen: The case of nimesulide, a Cox-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drug in the dog. *J Vet Pharmacol Ther* 24(1): 43-55.
- Traore M, Maitte M, Delerm B, Roy J-C, Sequeira H (1998). Opioid peptide involvement in the bulbar inhibition of electrodermal activity in the cat. *J Physiol* 92(1): 17-23.
- Trumble TN, Billingham RC, McIlwraith CW (2004). Correlation of prostaglandin E₂ concentrations in synovial fluid with ground reaction forces and clinical variables for pain or inflammation in dogs with osteoarthritis induced by transection of the cranial cruciate ligament. *Am J Vet Res* 65(9): 1269-1275.
- Turk DC, Dworkin RH, McDermott MP, Bellamy N, Burke LB, Chandler JM, Cleeland CS, Cowan P, Dimitrova R, Farrar JT, Hertz S, Heyse JF, Iyengar S, Jadad AR, Jay GW, Jermano JA, Katz NP, Manning

- DC, Martin S, Max MB, McGrath P, McQuay HJ, Quessy S, Rappaport BA, Revicki DA, Rothman M, Stauffer JW, Svensson O, White RE, Witter J (2008). Analyzing multiple endpoints in clinical trials of pain treatments: IMMPACT recommendations. *Pain* 139(3): 485-493.
- Vainio O (2012). Translational animal models using veterinary patients – an example of canine osteoarthritis (OA). *Scand J Pain* 3(2): 84-89.
- van Oostrom H, Stienen PJ, Doornenbal A, Hellebrekers LJ (2009). Nociception-related somatosensory evoked potentials in awake dogs recorded after intra epidermal electrical stimulation. *Eur J Pain* 13(2): 154-160.
- Vasseur PB, Johnson AL, Budsberg SC, Lincoln JD, Toombs JP, Whitehair JG, Lentz EL (1995). Randomized, controlled trial of the efficacy of carprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in the treatment of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 206(6): 807-811.
- Veissier I, Rushen J, Colwell D, de Passillé AM (2000). A laser-based method for measuring thermal nociception of cattle. *Appl Anim Behav Sci* 66(4): 289-304.
- Vergnolle N (2010). Visceral afferents: What role in post-inflammatory pain? *Auton Neurosci* 153(1–2): 79-83.
- Verwaerde P, Estrade C (2005). Les étapes de l'anesthésie générale. Vademecum d'anesthésie des carnivores domestiques. Verwaerde P and Estrade C. Paris, France, Editions med'com: 122-125.

- Vickers KJ, Niel L, Kiehlbauch LM, Weary DM (2005). Calf response to caustic paste and hot-iron dehorning using sedation with and without local anesthetic. *J Dairy Sci* 88(4): 1454-1459.
- Vierck CJ, Green M, Yeziarski RP (2010). Pain as a stressor: Effects of prior nociceptive stimulation on escape responding of rats to thermal stimulation. *Eur J Pain* 14(1): 11-16.
- Wagner AE, Mich PM, Uhrig SR, Hellyer PW (2010). Clinical evaluation of perioperative administration of gabapentin as an adjunct for postoperative analgesia in dogs undergoing amputation of a forelimb. *J Am Vet Med Assoc* 236(7): 751-756.
- Wagner AE, Worland GA, Glawe JC, Hellyer PW (2008). Multicenter, randomized controlled trial of pain-related behaviors following routine neutering in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 233(1): 109-115.
- Walker KA, Duffield TF, Weary DM (2011). Identifying and preventing pain during and after surgery in farm animals. *Appl Anim Behav Sci* 135(3): 259-265.
- Wall PD (1992). Defining "pain in animals". *Animal Pain*. Short CE and Van Poznak A. New York Churchill Livingstone: 63-79.
- Walton MB, Cowderoy E, Lascelles D, Innes JF (2013). Evaluation of construct and criterion validity for the 'Liverpool Osteoarthritis in Dogs' (LOAD) clinical metrology instrument and comparison to two other instruments. *PLoS One* 8(3): e58125.
- Wang Q, Breinan HA, Hsu H-P, Spector M (2000). Healing of defects in canine articular cartilage: Distribution of nonvascular α -smooth muscle actin-containing cells. *Wound Repair Regen* 8(2): 145-158.

- Waxman AS, Robinson DA, Evans RB, Hulse DA, Innes JF, Conzemius MG (2008). Relationship between objective and subjective assessment of limb function in normal dogs with an experimentally induced lameness. *Vet Surg* 37(3): 241-246.
- Weber GH, Morton JM, Keates H (2012). Postoperative pain and perioperative analgesic administration in dogs: Practices, attitudes and beliefs of Queensland veterinarians. *Aust Vet J* 90(5): 186-193.
- Wegner K, Horais KA, Tozier NA, Rathbun ML, Shtaerman Y, Yaksh TL (2008). Development of a canine nociceptive thermal escape model. *J Neurosci Methods* 168(1): 88-97.
- Welsh EM, Gettinby G, Nolan AM (1993). Comparison of a visual analogue scale and a numerical rating scale for assessment of lameness, using sheep as a model. *Am J Vet Res* 54(6): 976-983.
- Wenger S, Moens Y, Jaggin N, Schatzmann U (2005). Evaluation of the analgesic effect of lidocaine and bupivacaine used to provide a brachial plexus block for forelimb surgery in 10 dogs. *Vet Rec* 156(20): 639-642.
- Wernham BGJ, Trumpatori B, Hash J, Lipsett J, Davidson G, Wackerow P, Thomson A, Lascelles BDX (2011). Dose reduction of meloxicam in dogs with osteoarthritis-associated pain and impaired mobility. *J Vet Intern Med* 25(6): 1298-1305.
- Whay HR, Waterman AE, Webster AJ (1997). Associations between locomotion, claw lesions and nociceptive threshold in dairy heifers during the peri-partum period. *Vet J* 154(2): 155-161.

- Whay HR, Waterman AE, Webster AJ, O'Brien JK (1998). The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *Vet J* 156(1): 23-29.
- Whay HR, Webster AJ, Waterman-Pearson AE, Webster AJF (2005). Role of ketoprofen in the modulation of hyperalgesia associated with lameness in dairy cattle. *Vet Rec* 157(23): 729-733.
- White BJ, Coetzee JF, Renter DG, Babcock AH, Thomson DU, Andresen D (2008). Evaluation of two-dimensional accelerometers to monitor behavior of beef calves after castration. *Am J Vet Res* 69(8): 1005-1012.
- Wiese AJ, Muir WW, Wittum TE (2005). Characteristics of pain and response to analgesic treatment in dogs and cats examined at a veterinary teaching hospital emergency service. *J Am Vet Med Assoc* 226(12): 2004-2009.
- Williams MD, Kirkpatrick AE, Griffith E, Benito J, Hash J, Lascelles BDX (2014). Feasibility and repeatability of thermal quantitative sensory testing in normal dogs and dogs with hind limb osteoarthritis-associated pain. *Vet J* 199(1): 63-67.
- Wiseman-Orr ML, Nolan AM, Reid J, Scott EM (2004). Development of a questionnaire to measure the effects of chronic pain on health-related quality of life in dogs. *Am J Vet Res* 65(8): 1077-1084.
- Wiseman-Orr ML, Scott EM, Reid J, Nolan AM (2006). Validation of a structured questionnaire as an instrument to measure chronic pain in dogs on the basis of effects on health-related quality of life. *Am J Vet Res* 67(11): 1826-1836.

- Wiseman ML, Nolan AM, Reid J, Scott EM (2001). Preliminary study on owner-reported behaviour changes associated with chronic pain in dogs. *Vet Rec* 149(14): 423-124.
- Woolf CJ (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152(3, Supplement): S2-S15.
- Wu H-E, Gemes G, Zoga V, Kawano T, Hogan QH (2010). Learned avoidance from noxious mechanical stimulation but not threshold semmes weinstein filament stimulation after nerve injury in rats. *J Pain* 11(3): 280-286.
- Xu J, Brennan TJ (2009). Comparison of skin incision vs. skin plus deep tissue incision on ongoing pain and spontaneous activity in dorsal horn neurons. *Pain* 144(3): 329-339.
- Xu J, Brennan TJ (2010). Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. *Anesthesiology* 112(1): 153-164.
- Yamada M, Tokuriki M (2000). Spontaneous activities measured continuously by an accelerometer in Beagle dogs housed in a cage. *J Vet Med Sci* 62: 443-447.
- You H-J, Dahl Morch C, Chen J, Arendt-Nielsen L (2003). Simultaneous recordings of wind-up of paired spinal dorsal horn nociceptive neuron and nociceptive flexion reflex in rats. *Brain Res* 960(1-2): 235-245.
- Yu D, Liu F, Liu M, Zhao X, Wang X, Li Y, Mao Y, Zhu Z (2013). The inhibition of subchondral bone lesions significantly reversed the weight-bearing deficit and the overexpression of CGRP in DRG Neurons, GFAP and Iba-1 in the spinal dorsal horn in the

monosodium iodoacetate induced model of osteoarthritis pain. *PLoS One* 8(10): e77824.

Yu DG, Yu B, Mao YQ, Zhao X, Wang XQ, Ding HF, Cao L, Liu GW, Nie SB, Liu S, Zhu ZA (2012). Efficacy of zoledronic acid in treatment of teoarthritis is dependent on the disease progression stage in rat medial meniscal tear model. *Acta Pharmacol Sin* 33(7): 924-934.

Zayan R (1986). Assessment of pain in animals: epistemological comments. in *Proceedings. Workshop Assess Pain Farm Anim*: 1-15.

Zhuo M (2011). Cortical plasticity as a new endpoint measurement for chronic pain. *Mol Pain* 7(1): 54.

Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2): 109-110.

ANNEXES

Annexe I – Données complémentaires sur la vidéo-analyse, étude #1

Étude pilote de comparaison qualitative de comportements bovins en absence et présence de douleur

Méthode : Observation qualitative des comportements observables avant et après l'induction de la douleur viscérale chez la vache.

Lors de l'étude pilote, les observations ont été réalisées sur deux périodes de deux heures avant et après l'induction de la douleur viscérale qui consistait à implanter une pince sur la paroi du réseau.

Résultat :

- Liste non exhaustive des observations au cours de la phase pré-opératoire

Conditions de régie :

Animaux à l'attache : collier + chaîne

Traite deux fois par jour le matin entre 6h30 et 7h30 et le soir entre 15h30 et 16h00

Alimentation : fourrage distribué au cours de la traite par ceux qui font la traite puis distribution de concentré 1 heure après le repas par le technicien du CRRA.

Abreuvement automatique par des pipettes situées au dessus de bols. Il y a un bol pour 2 vaches

Mise en place d'une auge qui contient l'alimentation devant les animaux

Séparation des animaux par une cloison de bois au niveau latéral

Nettoyage des loges deux fois par jour

Conditions d'expérimentations :

Passages fréquents des évaluateurs avec des mesures systématiques en post op. Surtout le matin (VAS, clinique, algésimétrie, PS, pesée, prélèvement de liquide céphalorachidien

Observation :

Position :

Debout > couché

Posture :

Corps : dos droit

Membres : posé sur 3 ou 4 membres, position équilibrée des membres, si couchée membres repliés sous le corps

Tête : souvent abaissée située au niveau de l'abreuvoir,

Activité :Alimentation :

Fouge le fourrage,

Joue avec le foin,

Cherche le concentré,

Attrape une quantité importante de foin souvent associé à un mouvement ventro-latéral ample de la tête + cou,

Réalise des mouvements amples de la mâchoire au cours de la mastication -souvent accompagnés de mouvements bilatéraux asynchrones des oreilles

Rumination souvent en position couchée avec mouvement des oreilles surtout durant la phase de retour du bol alimentaire

Face :

Beaucoup de mimiques faciales (oreilles, arcades sourcilières et narines) au cours de l'alimentation+rumination et passage de personnes

Locomotion :

Déplacements des membres postérieurs par petites échappées souples (surtout pour libérer un champ de vision d'un côté ou de l'autre de l'animal

Mouvement de la tête+ encolure pour suivre les déplacements devant et derrière la vache.

Peu de déplacements (piétinements ou changement de position sans raison de stimulation extérieure) des membres antérieurs

Déplacements des postérieurs plus fréquents (mouches/insectes, pipi de la voisine... elles n'aiment pas se salir pour la plupart ou être salies par la voisine... voire, elles préfèrent salir la loge de la voisine...)

Mobilisation de la queue, du corps et des membres (membres écartés) pour les besoins puis retour rapide à la position initiale

Mouvements latéraux de la tête fréquents

Mobilité de la queue, de l'encolure (chasse les mouches avec rapidité et de façon fréquente)

Soins :

Léchage des membres (os canon pour les antérieurs avec une extension de ce dernier en avant, souvent léchage, grattage au niveau du pli de l'aine avec forte mobilisation du cou et levé du membre postérieur

Léchage de l'encolure des voisines (mais à une vache correspond une voisine de toilettage et par forcément une autre)

Interaction humaine :

Le constat :

Excellente ouïe (bruit de portes, bruit de pas...), ce qui fait que tout entrée dans le bâtiment, même à distance de la salle bovine et sans visibilité est détectée. Les vaches réalisent un mouvement de la tête vers le bruit et déplacement des oreilles suivi d'une immobilisation du corps

Avec l'animalier :

Appel l'animalier pour le concentré, suit l'animalier depuis l'entrée dans la salle jusqu'à la distribution du concentré. Le mouvement de la tête suit le déplacement du bol de concentré. Une fois le concentré distribué, la vache s'intéresse moins à l'animalier

Lors du nettoyage à l'arrière des animaux : piétinements postérieurs voire des petits sauts, retrait sur le côté ou vers l'avant

Avec les expérimentateurs :

Fuite :

Déplacement vif avec éloignement du corps

Tête basse en position opposée à l'homme

Parfois saut des postérieurs de façon synchrone. (« Saut de biche »)

Mettre en place le licol : recul, éloignement de la tête, parfois levé brutal de la tête + encolure pour se libérer de notre présence

Peu de réaction :

Accepte la présence sans réaction vive mais mobilise le corps pour réaliser une surveillance, puis après un temps d'adaptation retrouve sa position avant notre approche

Défense/agacement.:

Si situé à l'avant : mouvement brusque de la tête comme pour pousser ou charger : mouvement de la tête du bas vers le haut et l'avant

Levé du membre postérieur (prévient)

Déplacent vif de la queue... comme si on était une mouche !

Interaction avec les autres vaches :

Toilettage

Léchage

Toucher du museau avec la langue

Poussé de certaines vaches (intimidation ??) par exemple lors de l'abreuvement ou lors de l'alimentation (l'une des auges est remplie et pas l'autre)

Meuglement

- Liste non exhaustive des observations au cours de la Phase post-opératoire

Les descriptions du pré-opératoire ont été observées en phase post-opératoire. Parfois selon la même intensité et fréquence mais souvent de façon moins intense, moins ample et moins fréquent, voir parfois absent

Ce que j'ai observé de différent :

Position :

Debout >>couché

Ou Debout <<couché

Posture :

Tête en self auscultation,

Encôlure tendue,

Tête posée sur un support (auge ou abreuvoir ou parie de la cage, souvent tête en position très haute ou très basse

Si couchée : membre parfois non placé sous le corps mais positionné sur le coté ou devant la tête

Corps voûté

Membres antérieurs écartés (position des coudes)

Parfois vache très sale et couchée sur ses selles et urine

Activité :

Alimentation :

Fouge sans prise alimentaire
 Brin de paille fixé aux lèvres
 Approche de la nourriture puis indifférence
 Hypersalivation
 Abreuvement excessif

Face :

Mimiques faciales
 Léchage des narines avec la langue
 Grincement de dent, mouvements latéraux de dents sans alimentation
 Yeux exorbités, regard fixe

Locomotion :

Immobilisation d'une partie ou totalité du corps
 Léchage de plaie
 Mouvement de tête vers la plaie
 Piétinements
 Très grande mobilisation du corps lors défécation et urine
 Lenteur au levé parfois levé impossible

Interaction humaine :

Désintérêt à l'environnement sonore

Avec l'animalier :

Fuite, retrait, indifférence+++

Avec les expérimentateurs :

Fuite : +/-

Peu de réaction : +++

Défense/agacement.: +/-

Interaction avec les autres vaches :

Parfois recherche le contact avec une voisine

Annexe II – Curriculum Vitae

Pascale Rialland

Docteur Vétérinaire, Doctorante, Manager scientifique

Formations universitaires et diplômes

| | |
|-------------|---|
| 2007 - | Étudiante au programme de Doctorat (PhD) en sciences vétérinaires , of pharmacologie Université de Montréal, Canada – Directeur: Pr E. Troncy & Dr J. del Ca |
| 2005 - 2007 | Maîtrise en biomédecine vétérinaire , Université de Montréal, Canada – Directeur: Pr E. Troncy & Dr J. del Ca |
| 2000 | Thèse d'exercice de Médecine Vétérinaire, Université Claude-Bernard, France – Directeur: Pr J. Viallard |
| 1994-1998 | Diplôme d'étude de formation vétérinaire , École Nationale Vétérinaire de Lyon, France |

Cours universitaires

| | |
|---|-----|
| McGill University (Québec, Canada) | |
| Pain measurement in children (NUR2635) | 200 |
| Université de Montréal (Québec, Canada) | |
| Progrès en pharmacologie moléculaire (PHL 6085) | 200 |
| Principes de l'expérimentation animale (PHL 6025) | 200 |
| Médecine moléculaire (MMD 6001) | 200 |
| Pharmacologie de la douleur (PHL 6035) | 200 |
| Communications scientifiques écrites (PLU 6054) | 200 |
| Communications scientifiques orales (PLU 6055) | 200 |
| Statistiques appliquées vétérinaires (PTM 6601) | 200 |

Intérêts en recherche

Mesure et modélisation statistique des effets de la douleur aiguë et chronique chez les bovins et les chiens (douleur chirurgicale et arthrose canine) réalisée au cours d'études cliniques et de recherche fondamentale.

Bourses de formation universitaire

| | | | |
|-----------|---|-----------|--------------|
| 2011-2012 | Bourse nationale Canadienne BMP innovation FRQ-NT- CRNSG | Doctorale | 27 000\$ × 2 |
| 2007-2010 | Bourse interne | Doctorale | 11 000\$ par |
| 2005 | Bourse interne | Maîtrise | 4 000 \$ |

Publications

- Rialland P**, Otis C, Moreau M, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Beaudry F, del Castillo JR, Bertaim T, Gauvin D, Troncy E (soumis en 2013, PAIN). Association between sensitization and pain related behaviors in an experimental canine model of osteoarthritis.
- Ferchichi S, Troncy E, Guillot M, **Rialland P**, Truchetti G, del Castillo JRE (2013). Excitatory responses in dogs recovering from alfaxalone anaesthesia: is the absent drug blamed in excitation? *Vet Anaesth Analg* 40(6): 655-656.
- Rialland P**, Otis C, de Courval M-L, Mulon PY, Harvey D, Bichot S, Gauvin D, Livingstone Beaudry F, Hélie P, Frank D, del Castillo JRE, Troncy E (accepté dans *J Dairy Sci* 2013). Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospectively blinded, randomised and controlled study focusing on spinal pain proteomics.

Pascale Rialland

- Rialland P**, Authier S, Guillot M, del Castillo JRE, Veilleux-Lemieux D, Frank D, Gauv Troncy E. (2012). Validation of orthopedic postoperative pain assessment in dogs: A prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. *PLoS One* 7(11): e4948.
- Rialland P**, Bichot S, Lussier B, Moreau M, Beaudry F, del Castillo JRE, Gauvin D, Troncy E. (2012). Effect of a green-lipped mussel-enriched diet on pain behaviours and joint functioning in dogs with clinical osteoarthritis. *Can Vet J* 77(1): 66-74.
- Rialland P**, Bichot S, Moreau M, Guillot M, Lussier B, Gauvin D, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Troncy E. (2012). Clinical validity of outcome pain measures in naturally occurring canine osteoarthritis. *BMC Vet Res* 8(1): 162.
- Moreau M, **Rialland P**, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, Caron D, Lussier B, del Castillo JRE, Beauchamp G, Gauvin D, Bertaim T, Thibaut Troncy E. (2011). Tiludronate treatment improves structural changes and signs of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 13(3): R98.
- Guillot M, **Rialland P**, Nadeau MÈ, del Castillo JRE, Gauvin D and Troncy E. (2011). Pain Induced by a Minor Medical Procedure (Bone Marrow Aspiration) in Dogs: Comparison of Pain Scales in a Pilot Study. *J Vet Intern Med* 25(5): 1050-1054.
- Gervais JA, **Rialland P et al.** (2009). Douleur bovine : Comprendre la problématique pour relever le défi. *La Dépêche Vétérinaire* Suppl. 116: 33-40.
- Rialland P**, Holopherne C *et al.* (2008). Pharmacologie anti-douleur chez les bovins. *Numéro spécial Bulletin des GTV* 44: 27-34.
- Rialland P**, Aubry P *et al.* (2008). Évaluation de la douleur et efficacité des analgésiques chez les animaux de rente: Données actuelles et bilan de la littérature. *Numéro spécial Bulletin des GTV* 44: 19-24.

Couverture médiatique

Février 2008 **Canal savoir**, Un mal de chien, ça existe

Prix et distinctions

| | | |
|------|--|---|
| 2011 | Vétoquinol, excellence en gériatrie canine | I |
| 2011 | Fondation l'Air d'Aller | I |
| 2010 | Fondation l'Air d'Aller | I |
| 2009 | Mérial, excellence en recherche sur la douleur | I |
| 2007 | Bourse d'excellence d'admission au programme de Doctorat | I |
| 2005 | Mérial, excellence en recherche sur la douleur | I |

Activités de recherche associées, implications communautaires

| | | |
|---|---|----|
| Arthrolab Inc. | Dr JP. Pelletier et Dr É. Troncy: douleur comportementale et neurosensorielle | 20 |
| Arthrolab Inc. | Dr É. Troncy : douleur postopératoire | 20 |
| Faculté de médecine vétérinaire | Dr J del Castillo : statistique et SAS | 20 |
| Faculté de médecine vétérinaire | Dre M-E. Nadeau : douleur et ponction lombaire | 20 |
| Faculté de médecine vétérinaire | Dr É. Troncy : douleur bovine et vidéo-analyse | 20 |
| Comité d'éthique d'utilisation des animaux (CÉUA) | Membre | 20 |
| Club de lecture du GREPAQ | Fondatrice /organisatrice | 20 |
| Pain In Children Health (PICH) | Membre autorisée | 20 |
| Réseau Québécois de Recherche sur la douleur | Membre autorisée | 20 |