

La douleur chronique articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde: rôle des canaux ASIC3 dans l'athralgie induite par les ACPA et des voies de signalisation NGF/TrkA dans la douleur chronique inflammatoire

Lauriane Delay

▶ To cite this version:

Lauriane Delay. La douleur chronique articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde : rôle des canaux ASIC3 dans l'athralgie induite par les ACPA et des voies de signalisation NGF/TrkA dans la douleur chronique inflammatoire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS017 . tel-02918095

HAL Id: tel-02918095 https://theses.hal.science/tel-02918095v1

Submitted on 20 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université (Décret du 5 Juillet 1984)

Spécialité Neurosciences

Soutenue le vendredi 30 Novembre 2018 par

Lauriane DELAY

La douleur chronique articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde :

rôle des canaux ASIC3 dans l'arthralgie induite par les ACPA et des voies de

signalisation NGF/TrkA dans la douleur chronique inflammatoire

Rapporteurs	Pr. Véronique BREUIL Dr. Emmanuel DEVAL Dr. Sophie PEZET	Service de Rhumatologie – CHU, Nice IPMC – UMR 7275 CNRS, Valbonne ESPCI – UMR 8249 CNRS, Paris
Membres	Dr. Fabien MARCHAND - directeur de thèse Dr. Lénaic MONCONDUIT Dr. Aziz MOQRICH	NeuroDol – UMR 1107 Inserm, Clermont-Ferrand NeuroDol – UMR 1107 Inserm, Clermont-Ferrand IBDML – UMR 6216 CNRS, Marseille

NeuroDol UMR 1107 INSERM/UCA Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand



A la mémoire de ma maman, Evelyne

Remerciements

Je remercie, en premier lieu, le professeur Alain Eschalier et le professeur Denis Ardid de m'avoir accueillie au sein du laboratoire NeuroDol et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie le professeur Véronique Breuil et le docteur Emmanuel Deval d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie, bien sûr, le docteur Sophie Pezet, d'une part, pour avoir participé à l'évolution de ces travaux en participant à mes comités de suivi de thèse et d'autre part, de me faire l'honneur aujourd'hui d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie le docteur Aziz Moqrich d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse mais surtout pour nous avoir permis de travailler sur le principal outil de ma thèse : les souris TrkA/C. Je remercie aussi le docteur Lénaïc Monconduit d'avoir accepté de participer à ma thèse en tant que membre.

Je remercie le professeur Martin Soubrier, pour avoir contribué à ce travail, en participant à mes comités de suivi de thèse et les discussions enrichissantes d'un point de vue clinique.

J'adresse un immense merci à mon directeur de thèse Fabien Marchand. Merci d'avoir accepté de m'encadrer durant cette thèse et pour toutes les idées, les conseils, ta disponibilité et l'aide précieuse notamment dans la rédaction de ce manuscrit. Je te remercie pour l'investissement que tu as pu mettre dans ce travail ainsi que la qualité et la pertinence de tes commentaires et de tes corrections. Ce fut pour moi, une très belle aventure professionnelle en espérant avoir été à la hauteur de tes attentes. Merci aussi pour toutes les opportunités que tu m'as offertes, et notamment pour m'avoir permis de collaborer avec l'équipe de Camilla Svensson et, avec Julie, de nous avoir permis de réaliser cette expérience suédoise. Et merci aussi pour les moments passés à San Diego et toutes ces conversations.

J'adresse un merci tout particulier à Julie Barbier ou plutôt « ma Juju » avec laquelle j'ai travaillé dès mon arrivée au laboratoire. Tout d'abord, merci pour tout ce que tu m'as apporté professionnellement parlant, de m'avoir formé à de nombreuses techniques en me donnant toujours tes « petites astuces », merci pour toute l'aide que tu m'as apporté dans ces travaux de thèse. Cette thèse est aussi là en partie là grâce à toi et je suis très heureuse de pouvoir présenter ces travaux aujourd'hui. Merci aussi d'avoir pris le temps de relire et d'avoir apporté tes corrections à ce manuscrit. Et bien sûr, ma Juju, je te remercie pour ce tu m'as apporté amicalement. A notre séjour suédois à Stockholm où je ne garde que de bons souvenirs (à part peut-être le coup de la valise !), ce fut une super expérience personnelle, professionnelle et culturelle. Je penserais à toi quand je choisirai ma décoration scandinave ! Merci de m'avoir soutenu dans mes coups durs et mes multiples remises en question. Je vous souhaite, avec Nico, énormément de bonheur dans cette nouvelle vie de parents qui vous attend, vous serez sans aucun doute « topissime ». J'ai maintenant qu'une hâte, c'est de rencontrer ce petit bonhomme !! Je terminerais par quelques mots en suédois : Tack för allt du tog med mig ma Juju et bien sûr vivement 2021!

Je remercie bien sûr les thésards (ou ancienne thésarde !) avec qui nous avons partagé cette aventure :

Merci bien sûr à Manon, pas uniquement ma voisine de bureau mais surtout une belle personne, toujours présente et disponible. Je n'oublierai pas nos soirées remarquables notamment en début de thèse mais aussi tous les moments que l'on a passé à discuter au boulot ou en dehors. Je sais que je peux penser à tes gaffes ou à tes tours de « magie » plus rigolos que spectaculaires si je veux rigoler un peu. Je te souhaite que du bonheur pour cette nouvelle vie canadienne, avec de beaux projets en perspective, tu le mérites ! De toute façon on se verra bien à l'autre bout du monde ! Je vous adresse, avec Amélie un remerciement tout particulier pour m'avoir accordé du temps dans les moments difficiles alors que n'en n'aviez plus beaucoup.

Merci à notre réunionnaise adorée, Amélie, qui sait rayonner quand il le faut et qui, je trouve, a eu beaucoup de courage pour cette thèse. J'espère que nous t'avons apporté ce qu'il te fallait et je suis heureuse de tous les moments que nous avons partagés. Je te souhaite encore un peu de courage pour cette fin de thèse et de trouver un post-doctorat à la hauteur de tes attentes. Et j'espère bien qu'on se retrouvera autour d'un mojito à l'île de la Réunion ou bien à l'autre bout du monde.

Merci à notre Syssy, maître de la floume, pour nos discussions, soutien pendant la rédaction et je te souhaite de belles choses avec le petit Paul et Rose. Bon courage aussi pour la suite.

Je remercie Elodie B, à qui je souhaite pleins de bonnes choses pour la fin de thèse mais surtout pour l'après, Geoffroy, notre bible cinématographique, plein de courage tous tes projets, Mélissa, pour ces bons moments passés, bonne chance pour le reste de la thèse, Pierre-Yves, pour tes avis et tes conseils (sauf les diététiques !) et Guillaume.

Merci à toi Ludivine, pour ta pédagogie et ce que tu m'as appris ainsi que pour ton aide dans mes premières expérimentations. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et pour les moments passés. Je suis très heureuse que Lyly vous comble de bonheur, et je vous souhaite encore beaucoup de belles choses pour la suite...

Merci aux nouvelles recrues : Maëva, plein de courage pour ta thèse et merci pour ces moments tout en chanson et Julien, bon courage pour ton stage.

Merci aux post-doctorants : Madhi, pour ta chat et tes compliments, Roberto, pour nous avoir faire rire et pour nos discussions musicales et Florian, de m'avoir accompagnée dans cette fin de thèse, prend soin de Juju et Fabien et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie aussi celles qui ne sont plus au laboratoire aujourd'hui. Notre ancienne Matriarche Amandine, qui a dignement passé sa thèse en Juin 2017 et malgré que je ne sois parfois pas tout à fait dans mon élément dans la « team viscéral » tu m'as toujours aidé quand j'en avais besoin. Merci de nous avoir fait rire et conseillée pour tout et n'importe quoi et merci aussi de m'avoir épargné pour toutes tes bêtises. Je garderais en souvenir tes gommettes et les fameuses recherches google traduction en vietnamien, d'ailleurs en passant : « cẩm ơn bận rất nhiều ». Elodie P. ou madame bobo en espérant que tu te plairas à Lille dans ce nouveau boulot et j'espère que tu garderas de bons souvenirs de ces moments passés ensemble au sein du laboratoire. Marie, pour ce dynamisme et tes conseils, j'espère que nous aurons de nouveau l'occasion de partager de bons moments. Laura Samrani, madame gateaux, Alisson A. et Laura P. pour m'avoir intégré rapidement dans mes débuts au sein du laboratoire.

Un grand merci au bureau des filles, à Mireille Montbel qui sait veiller sur nous et qui reste toujours disponible et nous permet de travailler dans des conditions optimales, à Laetitia Prival, pour ta sympathie et bien sûr plein de bonheur pour cette deuxième venue, à Mathilde Fereyrolles, qui vient juste de nous quitter, encore félicitations et je te souhaite le meilleur pour ce nouveau job.

Je remercie les personnes qui ont participé aux projets Arth-Innov : Merci à Amélie Cohadon, même si tu n'es pas restée longtemps au laboratoire, nous avons travaillé ensemble sur un projet qui n'a pas abouti mais qui nous aura permis de bien nous connaitre. Je te souhaite le meilleur en tant que dentiste et je suis très fière de toi pour cette réussite et que tu puisses t'épanouir dans un nouveau travail. Merci à Eric Chapuy de m'avoir appris à travailler avec les rats avec de bons conseils et bien sûr pour le temps que tu as pu accorder à ce projet. Merci à Denis Ardid pour les conseils et le suivi de ce projet.

Merci à Youssef Aissouni, malgré nos galères de manips tu m'as toujours aidé et accompagné et je t'en remercie. Merci aussi pour les moments sympathiques en congrès, ce qui me permet de remercier Mélina Begou, Stéphane Loligner, Jérôme Busserolles puis encore Syssou et P-Y pour ces bons souvenirs à Marseille.

Merci à Agathe Gelot, Aurore Collin, Benoit Sion, Catherine Coudert, Chritine Courteix, Christophe Mallet, David Balayssac, Emilie Clémençon, Frédéric Carvalho, Frédéric Libert, Gwenaëlle Huchet, Laurence Daulhac-Terrail, Mathieu Meleine, Nicolas Authier, Stéphane Doly et aux membres de l'institut Analgésia : Alice Corteval, Nicolas Kerckove et Marine Magenties.

Merci aux filles du CICS : Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak, Lorraine Novais Gameiro et Sophie ainsi qu'à la plateforme de l'animalerie. Merci à Stéphanie Maupetit et Sandrine Viala pour leur aide pour la bioanalyse. Merci à notre informaticien toujours disponible, Rémy Robin-Monier.

Je remercie nos collaborateurs : du Karolinska Institute de Stockolm : Camilla Svensson, Alexandra Jurczak, Resti Rudjito, de l'université de Tamaulipas au Mexique : Juan Miguel Jimenez Andrade, Jaira Villarreal, de l'IBDML de Marseille : Aziz Moqrich, du groupe IMoST : Arnaud Briat, Elisabeth Miot-Noirault, Leslie Mazuel & Tiffany Witkowski, de l'unité de nutrition humaine : Yohann Wittrant.

Merci à la région, au Feder et à I-site CAP20-25 pour le financement de ces travaux.

Je terminerais par remercier les personnes qui sont présentes depuis bien plus longtemps :

Merci à mes amis, je ferais court parce que vous savez que je vous aime !! Merci encore à ma Sasa et Maumo, parce que vous êtes toujours là <3 Merci à ma namourx Aline, ma Cécilou et Margaux pour ces retrouvailles mensuelles qui m'ont fait tellement de bien <3 Merci à mon Lulu et aux Magical ! Merci à Laura L, Fufu, Théo, Kéno, Albin, Camille, Sarah, Louis, Caro, parce que quand on se voit rien ne change. Merci à Fuf, Laurus, Lélé, Fafou et Lisa. Merci à mes copains du « groupe des gars », Ben & Joujou, Galou, Tom & Pauline, Max, Val, Mitou, Pacaud, Def, Pachou, Pal, Masset. Merci à Quentin et Colin. Merci aux filles de la danse : Caro & Valy et Alexandra, Anne-Cath, Katya et Mireille d'avoir subi mes craquages et votre soutien! Je remercie aussi Guitou & Laura et Pascal & Isabelle, merci pour votre soutien et ces moments partagés tout du long de cette thèse. Merci à Florence D., d'être toujours là.

Merci à ma famille et en particulier à Jean-François et Isabelle pour votre soutien. Un immense merci à mon père, merci d'être là, de croire en mes projets et de me donner du courage. Merci pour chaque moment que l'on partage et de profiter de chaque moment. J'espère que même au bout du monde nous garderons cette relation. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Florence que je remercie aussi pour tout. Merci à ma petite mamie, Anna, pour nos repas hebdomadaire et d'avoir accepté parfois mon manque de temps mon impatience et d'avoir continué à me soutenir. Je remercie ma sœur, Aurélie à qui je souhaite le meilleur avec Steph mais aussi dans tous tes projets. Merci d'avoir toujours su trouver les mots qu'il faut. Je serais toujours là. Et merci pour les photos d'illustrations, je suis contente que tu sois représentée dans mon manuscrit. Merci à toi Hugo, merci pour ta présence, ton soutien et ton amour, que cette thèse nous amène vers de beaux voyages. Je vous aime profondément.

Résumé

La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie auto-immune qui affecte près de 1% de la population mondiale et se caractérise par une inflammation articulaire, des altérations cartilagineuses et osseuses notamment associées à des douleurs chroniques articulaires, souvent résistantes aux thérapeutiques actuelles. Que ce soit à un stade préclinique, où l'on parle d'arthralgie, ou à un stade établi de la pathologie, ces douleurs constituent un réel handicap pour les patients atteints avec plus de 60% d'entre eux insatisfaits de sa prise en charge. La présence d'une synovite étant nécessaire au diagnostic de la PR, aucune stratégie thérapeutique n'est mise en place à un stade préclinique. En outre, à un stade établi, la stratégie actuelle vise en premier lieu à diminuer l'activité de la pathologie sans prise en charge de la douleur en tant que telle.

Parmi les acteurs de la synovite dans la PR, un rôle essentiel est attribué au facteur de croissance des nerfs ou Nerve Growth Factor dans la mise en place et le maintien des symptômes douloureux. Les anti-NGF sont connus comme des molécules antalgiques prometteuses. Néanmoins, de par son action pléiotropique, cibler cette neurotrophine conduit à des effets indésirables potentiellement importants. Dans la première partie de ce travail, nous avons cherché à mieux caractériser l'implication spécifique des voies de signalisation intracellulaires au récepteur tyrosine kinase de type A (TrkA) de haute affinité au NGF, dans un contexte de douleur articulaire inflammatoire (arthrite) mais aussi de douleurs somatique et viscérale. Un modèle de knock-out total pour le récepteur TrkA n'étant pas viable, nous avons réalisé une étude multimodale chez des souris knock-in TrkA/C, exprimant un récepteur chimérique composé de la partie extracellulaire native du récepteur TrkA et des parties transmembranaire et intracellulaire fonctionnelles du récepteur à la neurotrophine 3 : le récepteur TrkC. Ce dernier n'étant que peu ou pas impliqué dans la douleur inflammatoire. Ainsi, le NGF pourra se lier normalement au récepteur TrkA/C mais activera les voies de signalisation intracellulaires du récepteur TrkC. Les résultats de nos études ont mis en évidence qu'une absence d'activation de certaines voies en aval de TrkA (i.e. c-Jun et p38 MAPK) au niveau des DRGs chez les souris TrkA/C, impacte significativement la mise en place des symptômes douloureux, en particulier l'hypersensibilité mécanique, que ce soit dans un contexte de douleur articulaire, somatique ou viscérale, sans affecter l'hyperalgie thermique au chaud. Ces résultats résultent d'une part de la diminution de la néoinnervation CGRP+ mais aussi de changements transcriptionnels de certains neurotransmetteurs et mécanotransducteurs dont le canal ionique sensible aux protons : ASIC3. De plus, un lien entre NGF/TrkA et le remodelage osseux, en particulier, l'activation ostéoclastique, a été démontré mettant en avant un rôle doublement bénéfique de l'inhibition de certaines voies associées à TrkA, à la fois dans certains symptômes douloureux et l'érosion osseuse retrouvée dans la PR.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans l'arthralgie induite par l'injection d'autoanticorps anti-peptides citrullinées (ACPA). La majorité des patients PR sont positifs pour les ACPA qui peuvent être produits des mois voire des années, avant son diagnostic et semblent être directement associés au développement des symptômes douloureux. Cette arthralgie constitue l'un des premiers signes d'une PR émergente et peu persister, même suite à la prise en charge thérapeutique des patients PR. Tout d'abord, nous avons confirmé que les sous-types monoclonaux IgG1 ACPA diffèrent par leurs propriétés pronociceptives et érosives de l'os, certainement liées à leurs différentes réactivités vis-à-vis des épitopes citrullinés. Ainsi, la combinaison des clones B02/B09 d'ACPA induits, chez les souris injectées, le développement de symptômes douloureux sans inflammation, mais associés à une altération de l'homéostasie osseuse. La libération, par les ostéoclastes activés, de certains facteurs (*e.g.* protons et/ou lipides), serait capable d'activer et de sensibiliser les canaux ASIC3 présents au niveau des fibres nociceptives, participant ainsi à l'arthralgie.

Abstract

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that affects nearly 1% people worldwide and is characterized by joint inflammation, cartilage and bone damages, associated with chronic joint pain, often resistant to current therapies. Whether at a preclinical stage, where we talk about arthralgia, or at an established stage of the pathology, pain constitutes a real burden for the patients with more than 60% rating their pain management has unsatisfactory. The presence of synovitis is necessary for the diagnosis of established RA, therefore, no real therapeutic strategy is used at a preclinical stage. In addition, at an established stage, the current strategy aimed primarily at reducing the activity of the pathology without an actual management of the pain as such.

Among the actors of synovitis in RA, Nerve Growth Factor plays a critical role in the establishment and maintenance of painful symptoms. Anti-NGF are known as promising analgesic drugs. Nevertheless, due to pleiotropic effects of NGF, targeting this neurotrophin leads to significant adverse effects. In the first part of this work, we sought to better characterize the specific involvement of intracellular signaling pathways of the high affinity tyrosine kinase A (TrkA) receptor of NGF in a context of inflammatory joint pain (arthritis), but also of somatic and visceral pain. Since a total knockout of TrkA receptor in mice is not viable, we performed a multimodal study in TrkA/C knockin mice, expressing a chimeric receptor composed of the native extracellular part of TrkA receptor and, the transmembrane and intracellular functional parts of the neurotrophin 3 receptor: TrkC receptor, which is not really involved in inflammatory pain. Thus, NGF can bind normally to the TrkA/C receptor but activates the intracellular signaling pathways downstream of TrkC receptor. Our results have shown that a lack of activation of certain TrkA pathways (*i.e.* c-Jun and p38 MAPK) in the DRGs of TrkA/C mice, has a significant impact on the development of painful symptoms, especially mechanical hypersensitivity in a context of articular, somatic, or visceral pain, without affecting heat thermal hyperalgesia. These effects result, on one hand, from the decrease of CGRP+ nerve sprouting and in another hand, from the transcriptional changes of some neurotransmitters and mechanotransducers including the proton-sensitive ion channel: ASIC3. In addition, our studies highlight a direct link between NGF/TrkA and bone remodeling, in particular, osteoclastic activity, suggesting a beneficial role of the inhibition of some specific TrkA-associated pathways, in both mechanical hypersensitivity and bone erosion found in RA.

In a second part of our work, we investigated the mechanisms involved in arthralgia induced by the injection of autoantibodies against citrullinated peptides (ACPA). The majority of RA patients is positive for ACPA that can be produced months to years before RA diagnosis and appear to be directly associated with the development of pain. Arthralgia is one of the first signs of an emerging RA and can persist even following RA treatment. First, we confirmed that monoclonal ACPA IgG1 subtypes differ in their pronociceptive and bone erosive properties certainly link to their reactivity patterns against citrullinated epitopes on different targets especially those engaging osteoclast activity. Thus, the combination of B02/B09 ACPA clones induced pain like behaviour without any inflammation, but is associated with an alteration of bone homeostasis in injected mice. We suggest that as a result of ACPA-induced osteoclast activation, certain factors (*e.g.* protons and/or lipids) are released, which sensitize ASIC3, ultimately leading to pain.

Enseignement

Module "Introduction à la génétique " – Licence 1^{ère} année (2016-2017) Module "Analyse et modélisation" – Bioinformatique / Biostatistiques – Licence 2^{ème} année (2015-2016)

Communications affichées ≻

International Association for the Study of Pain (IASP) (Septembre 2018 – Boston – USA)

Rheumatoid arthritis - autoantibody induced pain-like behavior and bone erosion - links to osteoclast activity and ASIC3-mediated sensitization

Jurczak A*, Delay L*, Barbier J, Krock E, Wigerblad G, Sandor K, Rogóż K, Briat A, Miot-Noirault E, Martinez A, Panwar P, Bromme D, Jiménez-Andrade JM, I. Catrina A, Klareskog L, Marchand F, Svensson CI.

Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (November 2017 – Nice – France)

Implication des voies de signalisation NGF/TrkA dans l'arthrite chez les souris knock-in TrkA/C: approche multimodale

Delay L, Barbier J, Boudieu L, Aissouni Y, Ardid D, Moqrich A, Briat A, Auzeloux P, Miot-Noirault E, Marchand F

Annual Meeting American College of Rheumatology (ACR) / Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) (November 2017 - San Diego - USA)

Involvement of Nerve Growth Factor and Tyrosine Kinase type A Receptor signaling pathways in Rheumatoid Arthritis in knock-in TrkA/C mice: multimodal approach

Delay L, Barbier J, Boudieu L, Aissouni Y, Ardid D, Moqrich A, Briat A, Auzeloux P, Miot-Noirault E, Marchand F

Communications orales ≻

Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement (Juin 2018 – Clermont-Ferrand – France)

Implication spécifique des voies de signalisation NGF/TrkA dans l'hypersensibilité mécanique et le remodelage osseux associés à une arthrite chez les souris knock-in TrkA/C

13^{ème} symposium du Réseau Français de Recherche contre la Douleur (Mars 2017 – Marseille -France)

Involvement of NGF/TrkA signaling in adjuvant-induced arthritis by a multimodal approach











Articles

c-Jun / p38 MAPK / ASIC3 pathways activated by NGF through TrkA is essential for mechanical allodynia development following somatic injury and to a lesser extent visceral injury

Chaumette T*, **Delay L*** Barbier J, Boudieu L, Aissouni Y, Lashermes A, Legha W, Antraigue S, Carvalho F, Eschalier A, Ardid D, Moqrich A, Marchand F – *en préparation*

Specific TrkA signalling pathways are essential for mechanical hypersensitivity development and bone remodelling in arthritis using knock-in TrkA/C mice

Delay L, Barbier J, Boudieu L, Aissouni Y, Ardid D, Moqrich A, Briat A, Auzeloux P, Miot-Noirault E, Moqrich A, Marchand F – *en préparation*

Anti-citrullinated protein autoantibodies induced pain-like behaviour and bone erosion – links to osteoclast activity and ASIC3-mediated sensitization

Jurczak A*, **Delay L***, Barbier J, Krock E, Wigerblad G, Sandor K, Rogóż K, Briat A, Miot-Noirault E, Martinez A, Panwar P, Bromme D, Jiménez-Andrade JM, I. Catrina A, Klareskog L, Marchand F, Svensson CI. – *en préparation*

SOMMAIRE

Liste des abréviations	i
Liste des figures et des tableaux	v
PARTIE A – Introduction bibliographique	1
CHAPITRE I : La polyarthrite chez l'adulte	3
Arthrite : définition et classification	
II. Généralités sur la polyarthrite rhumatoïde	3
L Description générale	i 4
2. Epidémiologie	
3. Etiologie	6
3.1. Génétique	6
3.1.1 Locus HLA	6
3.1.2 Loci non-HLA	7
3.2. Epigénétique	7
3.2.1 Méthylation de l'ADN	
3.2.2 Acétylation ou désacétylation des histones	8
3.2.3 MicroARNs	9
3.3. Environnementale	9
3.3.1 Cigarette	9
3.3.2 Microbiote	10
3.4. Immunologique – NETose et autophagie	
3.5. Hormonale	12
3.6. Psychologique	
4. Evaluation et diagnostique	13
4.1. Diagnostic de la PR	13
4.2. Bilan en imagerie	14
4.2.1 Techniques d'exploration classiques chez l'Homme	14
4.2.2 Technique d'exploration fonctionnelle : l'imagerie scintigraphique	14
a. Principes de base de l'imagerie scintigraphique	15
b. Utilisation des biphosphonates	16
c. Utilisation du NTP-15-5 comme marqueur précoce du remodelage du cartilage	16
4.3. Bilan biologique	17
4.3.1 Recherche du facteur rhumatoïde	17
4.3.2 Recherche d'autoanticorps	19
a. Autoanticorps anti-peptides citrullinés	19

b. Anticorps anti-peptides carbamylés	_21
c. Anticorps anti-malondialdéhyde-acétaldéhyde	_21
III. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde	_ 22
I. Les mécanismes physiopathologiques selon les stades de la pathologie	_ 22
I.I. PR préclinique	_ 22
I.2. PR précoce vers un stade établi	_ 24
1.2.1 Lésions cartilagineuses	_ 25
1.2.2 Lésions osseuses	_ 26
a. Remodelage osseux en condition physiologique	_ 26
b. Remodelage osseux dans la PR	_ 28
IV. Stratégies thérapeutiques dans le traitement de la PR	_ 30
I. Traitements symptomatiques	_ 30
I.I. Antalgiques	_ 31
I.2. Glucocorticoïdes	_ 32
2. Traitements de fond	_ 33
2.1. DMARDs synthétiques conventionnels - csDMARDs	_ 33
2.1.1 Méthotrexate	_ 33
2.1.2 Sulfasalazine	_ 35
2.1.3 Léflunomide	_ 35
2.2. DMARDs biologiques - bDMARDs	_ 35
2.2.1 Inhibiteurs des cytokines	_ 35
a. Anti-TNF	_ 35
b. Anti-II-6	_ 36
c. Anti-IL- I	_ 37
2.2.2 Inhibiteurs cellulaires	_ 37
a. Inhibiteurs des cellules T	_ 37
b. Inhibiteurs des cellules B	_ 38
2.3. DMARDs synthétiques ciblés – tsDMARDs	_ 38
2.4. Stratégie de traitement à entreprendre dans le cas d'une PR	_ 39
2.5. Notion de fenêtre thérapeutique	_ 40
V. Problématique actuelle : manque de prise en charge de la douleur dans la polyarthrite rhumatoïde	41
CHAPITRE 2 : La douleur articulaire dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde	_ 43
I. Douleur et nociception : généralités	43
I. Définition de la douleur aiguë <i>versus</i> chronique	_ 43
2. Nociception à l'origine de la perception douloureuse	_ 44
II. Mécanismes à l'origine de la douleur – Transmission du message nociceptif et sa modulation	_ 45
I. Transduction au niveau périphérique par les nocicepteurs	_ 45
I.I. Généralités sur les nocicepteurs	_ 45

	I.I.I Fibres afférentes primaires - classification	45
	I.1.2 Fibres afférentes primaires innervant l'articulation	46
1.2.	Activation des différents types de nocicepteurs	48
	I.2.1 Activation des nocicepteurs par des stimuli thermiques	48
	I.2.2 Activation des nocicepteurs par des stimuli mécaniques	49
	a. Les différents types de mécanorécepteurs	49
	b. Les mécanorécepteurs à haut seuil d'activation	50
	I.2.3 Activation des nocicepteurs par des stimuli chimiques	51
١.3.	Rôle du canal ASIC3 au niveau articulaire	53
2. La co	nduction du message nerveux nociceptif et sa modulation au niveau central	56
2.1.	La corne dorsale de la moelle épinière – modulation spinale	56
2.2.	Le tronc cérébral et les centres supérieurs – modulation supra-spinale et corticale	58
III. La douleu	r dans la polyarthrite rhumatoïde : d'une arthralgie vers une douleur articulaire	
inflammat	oire chronique	60
I. L'arth	ralgie	61
1.1.	Rôle des ACPA dans l'arthralgie	61
١.2.	Rôle potentiel des anti-CarP dans l'arthralgie	64
١.3.	Rôles des cytokines dans l'arthralgie	65
2. La do	uleur articulaire chronique au stade de PR établie	66
2.1.	Sensibilisation périphérique	67
2.2.	Sensibilisation centrale	69
2.3.	Composante neuropathique de la douleur articulaire	71
IV. Probléma	tique actuelle : le manque d'innovation thérapeutique : d'une meilleure compréhensior	ı des
mécanism	es vers l'innovation	72
CHAPITRE 3 :	Le facteur de croissance des nerfs ou Nerve Growth Factor	73
I. Généralit	és sur les neurotrophines	73
I. Déco	uvertes des neurotrophines	73
1.1.	Synthèses des neurotrophines	74
1.2.	Récepteurs aux neurotrophines	74
١.3.	Rôles des neurotrophines	75
	I.3.1 Le BDNF	75
	1.3.2 La neurotrophine 3	76
	1.3.3 Les neurotrophines 4/5	77
2. Le fac	teur de croissance des nerfs - Nerve growth factor - NGF	78
2.1.	Structure et synthèse	78
2.2.	La signalisation par le NGF	78
	2.2.1 Le récepteur TrkA	79
	a. Structure et expression du récepteur TrkA	79

b. Internalisation et transport du complexe NGF-TrkA	80
c. Voies de signalisation activées	80
2.2.2 Le récepteur p75 ^{NTR}	82
a. Structure et expression du récepteur p75 ^{NTR}	82
b. Voies de signalisation activées par p75 ^{NTR}	83
c. Caractéristiques des différents complexes	84
2.3. Les différentes fonctions du NGF	84
2.3.1 Durant le développement	
II. NGF et douleur	88
I. Hyperalgie thermique et NGF	90
2. Hypersensibilité mécanique et NGF	92
III. Potentiels thérapeutiques et effets secondaires associés au blocage du NGF	97
IV. NGF et douleur articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde	
CHAPITRE 4 : Objectifs	103
PARTIE B – Résultats expérimentaux	105
Article n° l	
Article n°2	165
Article n°3	209
PARTIE C – Discussions et perspectives	251
Article n°1 & Article n°2	253
Article n°3	263
PARTIE D – Références bibliographiques	267

Liste des abréviations

A

5-ASA	Acide 5-AminoSalicylique
5-HT	5-HydroxyTryptamine ou Sérotonine
^{99m} Tc	Technétium-99 métastable
AA	AcétAldéhyde
ACC	Cortex Cingulaire Antérieur
ACPA	Anti-Citrullinated Protein Antibodies
ACR	American College of Rheumatology
ADA	Adénosine DéAminase
ADAMTs	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
AFA	Anticorps Anti-Filaggrine
AICAR	5-Aminolmidazole-4-CarboxAmide Ribonucléotide
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AKA	Anticorps Anti-Kératine
AME	Agence Médicale Européenne
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP	Adénosine Mono Phosphate
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazole PropionAte
AMPDA	Adénosine Mono Phosphate DéAminase
Anti-CarP	Anti-Peptides Carbamylés
Anti-CCP	Anti-Cyclic Citrullinated Peptide
APC	Antigen-Presenting Cell
APF	Facteur AntiPérinucléaire
ASIC	Acid-Sensing Ion Channel
ATF	Activating Transcription Factor

B

bDMARDs BDNF BG

С

CAIA	Collagen Antibody Induced Arthritis
CAMKII	protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline dépendante de type 2
Cat K	Cathepsine K
СВР	CRE-Binding Protein
CCL	Ligand de la Chimiokine
ССР	Peptide Cyclique Citrulliné
CD	Chopper Domain
CD68	Cluster de Différenciation 68
CDAI	Clinical Disease Activity Index
CeA	Amygdale
CEP-I	Peptide α-Enolase Citrulliné-1
CFA	Adjuvant Complet de Freund
CFU-GM	Colony-Forming Unit-Granulocyte Macrophage
CFU-S	Colony-Forming Unit-Spleen
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide

biologic Disease Modifying AntiRheumatic Drugs

Brain-Derivated Neurotrophic Factor

Ganglion Basal

cH2	Histone citrullinée
CI	Cortex Insulaire
CIA	Collagen-Induced Arthritis
CIDN	Contrôles Inhibiteurs Diffus induits par
C : 0	stimulation Nociceptive
Cit-fib	fibrinogène Citrulliné
Cit-vim	vimentine Citrullinèe
СМН	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	CytoMégaloVirus
COX	CycloOXygénase
CREB	Cyclic adesonine monophosphate Response Element-Binding protein
CRP	Protéine C Réactive
csDMARDs	conventional synthetic Disease Modifying AntiRheumatic Drugs
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte–associated Antigen
CXCL	CXC-chemokine Ligand
CXCR	CXC-chemokine Receptor
СҮР	CY cloPhosphamide
D	
D	Day
DAG	DiAcylGlycérol
DAN	réseau Dorsal de l'Attention
DAS	Disease Activity Score
DD	Death Domain
DMARDs	Disease Modifying AntiRheumatic Drugs
DMN	réseau du Mode par Défaut
DPD	2,3-DicarboxyPropane-1,1-Diphosphonate
DRASIC	Dorsal Root ASIC
DRGs	Dorsal Root Ganglia ou ganglions de la racine dorsale
E	
FRNIA	Antigène Nucléaire du virus d'Epstein-Barr
FBV	Virus d'Epstein-Barr
FLISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENlac/DEG	canaux sodiques Epithéliaux / DEGénérine
EP	rácenteur aux Prostaglandines
EPAC	Exchange Protein directly Activated by cAMP
	Extracellular signal Pagulated Kingses
	European League Against Phoumatism
EULAK	European League Against Kneumausin
F	
FAICAR	5-FormAmidoImidazole-4-CarboxAmide Ribonucléotide
FcR	Récepteur pour la partie constante des
FLS	Fibroblast-Like Synoviocytes
FR	Facteur Bhumatoïde

G

G2A	Récepteur au lysophosphatidylcholine
GABA	Acide-y AminoButyrique
GAP43	Growth Associated Protein 43
GC	GlucoCorticoïde
GDNF	Facteur Neurotrophique Dérivé des cellules Gliales
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GMP	Guanosine Mono Phosphate
gp 30	glycoprotéine 130
GPR3	G Protein-coupled Receptor 3
Grb2	Growth factor receptor bound protein-2
GWAS	Genome-Wide Association Study

Н

HI / H2	récepteur à l'Histamine I ou 2
HAS	Haute Autorité de Santé
HAT	Histones AcétylTransférases
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC	Histones DéACétylases
HDP	Hydroxyéthylène DiPhosphonate
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMDP	HydroxyMéthylène DiPhosphonate
HSAN	Hereditary Sensory Autonomic Neuropathy
нт	HypoThalamus
HTMs ou HT	High-Treshold Mechanoreceptors

IASP	International Association for the Study of Pain
IB4	Isolectine B4
IC	Intervalle de Confiance
IC50	Concentration Inhibitrice médiane
ICD	Insensibilité Congénitale à la Douleur
IFAA	International Foundation for Autoimmune and Autoinflammatory disease
IFN	InterFéroN
lg	Immunoglobuline
IL	InterLeukine
IMP	Inosine Mono Phosphate
IP	InterPhalangienne
IP ₃	Inositol triPhosphate
IPP	InterPhalangienne Proximale
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
IRM _f	Imagerie par Résonnance Magnétique fonctionnelle
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
J	
JAK	JAnus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase

Κ	
K2P	Canaux potassiques à 2 domaine pores ou domaines P
Kd	constante de dissociation
L	
Lc	Lymphocyte
LC	Locus Coeruleus
LEF	LEFlunomide
LTB ₄	LeucoTriène B4
LTMs ou LT	Low-Treshold Mechanoreceptors
LTP	Long Term Potentiation
Μ	°
МІ	cortex Moteur I
MAA	Malondialdéhyde-AcétAldéhyde
mAb	Anticorps monoclonal
MAGE	Melanoma-Associated antiGEn
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases
МСР	MétaCardo-Phalangienne
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDA	MalonDiAdéhyde
MDC	Modulation de la Douleur Conditionnée
MDP	Méthylène DiPhosphonate
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase
MEK	MAP ERK Kinase
MIA	MonolodoAcétate
miARN	microARN
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
МКК	MAP-Kinase Kinase
MMP	MétalloProtéase Matricielle
MMT	Medial Meniscal Tear
MoAr	MonoArthrite
MPO	MyéloPérOxydase
MTHFR	Méthylène TétraHydroFolate Réductase
MTP	MétaTarso-Phalangienne
MTX	MéthoTreXate
Ν	
Nal	lodure de sodium
Nav	canaux sodiques voltage dépendants
NEO	NEOmycine
NETose	Mort cellulaire associée à la formation de NETs
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF200	NeuroFilament de 200 kDa
ΝϜκΒ	Facteur Nucléaire Kappa B
NGF	Nerve Growth Factor

Nal	lodure de sodium
Nav	canaux sodiques voltage dépendants
NEO	NEOmycine
NETose	Mort cellulaire associée à la formation de NETs
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF200	NeuroFilament de 200 kDa
ΝϜκΒ	Facteur Nucléaire Kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NK-I	NeuroKinine I
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NRIF	Neurotrophin Receptor-Interacting Factor
NRM	Noyau Raphé du Magnus

NT	NeuroTrophine	SG	Substance Gélatineuse
NTP 15-5	N-(Triéthylammonium)-3-Propyl-[15]ane-N5	SH2	domaine d'Homologie 2 à Src
0		Shc	Src homology-2 containing protein
U		siRNA	small interference RNA
OB	OstéoBlastes	SMA	Cortex Moteur Supplémentaire
OC	OstéoClastes	SNC	Système Nerveux Central
OGRI	ovarian cancer GPRI	SNP	Système Nerveux Périphérique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
OPG	OstéoProtéGérine	Sos	Son of sevenless
Ρ		SP	Substance P
Ы		SSZ	SulfaSalaZine
PI P2	Purinorecepteur 1	STOML3	STOMatin-Like protein 3
P2	Purinorecepteur 2	-	
PA			
рА	polyAdenylee	т	Transmission
PAD	PeptidylArginine Deiminase	тэт	
PAG	substance Grise PeriAqueducale		Enzyme de Conversion du TNE Alpha
PB	noyau ParaBrachiale		T cell Death-Associated Cene 8
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	TEMP	Tomographie d'Emission Mono-Photonique
PFC	Cortex Pre-rontal		Tomographic par Emission de Positions
PGE2	ProstaGlandine E2	т.	
PI₃K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase		
РКС	Protéine Kinase C	тм	
PLC	PhosphoLipase C		Thursiding ManaPhasahata
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acétate		Esteur de Nécrose Turnerale
PR	Polyarthrite Rhumatoïde		
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor type		The restance of the former of
D	22	Traf6	The receptor associated factor 6
N			T artrate-Resistant Acia Phosphatase
RafK	Raf Kinase		
RANK	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B	TrkA	Recepteur Tyrosine Kinase A ou NTRKT
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B		Transient Receptor Potential
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed		Transient Receptor Potential Ankylin
	and Secreted		Transient Receptor Potential Melastatin
RAPID	Routine Assessment of Patient Index Data		Transient Receptor Potential Vanilloid
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G	tsDMARDs	target synthetic Disease Modifying AntiRheumatic Drugs
RF	Rheumatoid Factor	TYR	TYRosine kinase
RIP	Receptor Interacting-Protein	U	
ROS	Reactive Oxygen Species		
RVM	région Rostro-Ventrale-Médiane du bulbe	UMP	Uridine MonoPhosphate
RX	rachidien Ravon X	US	Echographie à UltraSons
		V	
S		VCN	Vitesse de Conduction Nerveuse
SI	cortex Somatosensoriel	VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

VS

W

WDR

Vitesse de Sédimentation

Wide Dynamic Range

SIcortex Somatosensoriel ISalSalineSAMS-AdénosylMéthionineSDAISimplified Disease Activity IndexSEShare EpitopeSFETDSociété Française d'Etude et de Traitement de
la Douleur

Liste des figures et des tableaux

FIGURES

Figure I : Classification des différents types d'arthrite	_ 3
Figure 2 : Schéma comparatif d'une articulation normale et d'une articulation arthritique au stade symptomatique	_ 4
Figure 3: Micrographie d'imagerie électronique illustrant la formation de NETs	П
Figure 4 : Principe de la scintigraphie	15
Figure 5 : Scintigraphie osseuse d'une patiente polyarthritique	16
Figure 6 : Structure chimique du ^{99m} Tc-NTP 15-5	17
Figure 7 : La réaction de citrullination ou désimination	20
Figure 8 : Sensibilité et spécificité des anticorps anti-peptides cycliques citrullinés	20
Figure 9 : De la susceptibilité à une polyarthrite rhumatoïde vers son établissement	23
Figure 10 : Dégradation du cartilage dans la polyarthrite rhumatoïde	26
Figure II : Ostéoclastogenèse	27
Figure 12 : La perte osseuse associée à une polyarthrite rhumatoïde	28
Figure 13 : Les différents paliers des antalgiques	31
Figure 14 : Mécanismes d'action potentiels du méthotrexate à de faibles doses dans la PR	33
Figure 15 : Schéma simplifié des mécanismes d'action du méthotrexate	34
Figure 16 : Recommandations de l'EULAR pour la stratégie du T2T de la polyarthrite rhumatoïde	39
Figure 17 : Pourcentage de patients présentant une douleur légère, modérée ou sévère et la satisfaction quant à sa	
prise en charge	41
Figure 18 : Les différents types de douleur	43
Figure 19 : Distribution anatomique de la nociception et de la perception douloureuse	44
Figure 20 : Innervation de l'os et de la peau	46
Figure 21 : Proportions de fibres Aβ, Aδ et C répondant aux mouvements douloureux ou indolores	47
Figure 22 : Seuil d'activation des canaux TRP en fonction de la température	49
Figure 23 : Les différents types de mécanorécepteurs cutanés	50
Figure 24 : Le canal ASIC3	54
Figure 25 : Organisation laminaire de la moelle épinière	56
Figure 26 : La théorie du portillon ou gate-control	57
Figure 27 : Voies cérébrales principales activées par un stimulus nociceptif	58
Figure 28 : Les différentes étapes de la douleur ressentie en fonction de l'activité de la pathologie	60
Figure 29 : La douleur dans les différentes phases de la PR	61
Figure 30 : Sensibilité mécanique (évoquée) suite à l'injection d'ACPA monoclonaux chez la souris	62
Figure 31 : Implication des ACPA dans le développement de l'arthralgie et dans l'amplification de la douleur	
articulaire	64
Figure 32 : Médiateurs de la sensibilisation périphérique	68
Figure 33 : Sensibilisation centrale	71
Figure 34 : Néoinnervation des fibres sensorielles au niveau du synovium suite à l'injection de CFA	72

Figure 35 : Micrographies de cultures in vitro de ganglions rachidiens de la moelle épinière cultivés en présence c	u
non de NGF	73
Figure 36 : Synthèse et sécrétion des neurotrophines	74
Figure 37 : Les neurotrophines et leurs récepteurs	75
Figure 38 : Structure du complexe 7S-NGF	78
Figure 39 : Liaison du NGF à ses différents récepteurs	79
Figure 40 : Voies de signalisation intracellulaire principalement activées par NGF/TrkA	82
Figure 41 : Les principales voies activées par le récepteur p75 ^{NTR}	84
Figure 42 : Distribution des sous-types neuronaux et expression des récepteurs neurotrophiques durant le	
développement et à l'âge adulte chez le rat et la souris	85
Figure 43 : NGF et douleur : les mécanismes périphériques et centraux	89
Figure 44 : Evaluation de la douleur chez des patients arthrosiques suite à un traitement par un anti-NGF : le	
tanézumab	98
Figure 45 : Schéma de la construction génétique pour la genèse des souris TrkA/C	_ 109
Figure 46 : Modèle Brennan de douleur post-opératoire	_ 110
Figure 47 : Modèle de cystite induit par l'injection de cyclophosphamide	_ 111
Figure 48 : Evaluation du comportement proprioceptif chez les souris TrkA/C hétérozygotes et knock-in par rap	ports
aux souris WT	_ 254
Figure 49 : Evaluation de l'inflammation articulaire et de l'allodynie mécanique dans le modèle CAIA induit dans	
différentes souches de souris	_ 260

TABLEAUX

Tableau I : Prévalence globale de la PR pour tous les âges puis par tranche d'âge à partir de 55 ans	5
Tableau 2 : Les 10 principaux gènes de susceptibilité pour le développement d'une PR	7
Tableau 3 : Altération du microbiote et polyarthrite rhumatoïde	10
Tableau 4 : Critères diagnostics de la polyarthrite rhumatoïde de 1987	13
Tableau 5 : Critères diagnostics de l'ACR et de l'EULAR de 2010	14
Tableau 6 : Fréquence du facteur rhumatoïde dans différentes conditions pathologiques	18
Tableau 7 : Historique de la recherche des autoanticorps anti-peptides citrullinés	19
Tableau 8 : Classification des fibres afférentes primaires	46
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différents transducteurs potentiels thermiques, mécaniques et chimiques	52

PARTIE A Introduction Bibliographique



CHAPITRE I : La Polyarthrite Rhumatoïde chez l'Adulte

I. Arthrite : définition et classification

L'arthrite du grec *arthron* : articulation, et du latin *ite* : inflammation correspond à « toute affection inflammatoire, aigüe ou chronique, qui atteint les articulations » (Larousse Médical). En réalité, elle constitue un terme générique regroupant plus d'une centaine de pathologies articulaires différentes de gravité variable. L'une des classifications possibles est présentée en **Figure 1**. Celle-ci permet de distinguer trois grands types d'arthrite. Le premier : l'arthrose, correspond à une arthrite non inflammatoire (le plus souvent) présentant une dégénérescence du cartilage articulaire associée à des anormalités osseuses. Le second : l'arthrite inflammatoire, se caractérise par une inflammation chronique, articulaire principalement et est communément associée à des symptômes systémiques. Le troisième et dernier type est l'arthrite septique. Elle est la conséquence du développement d'un germe bactérien au niveau articulaire. Parmi ces différents types d'arthrite, nous nous sommes particulièrement intéressés à la polyarthrite rhumatoïde (PR) qui, malgré des années de recherche, reste difficilement prise en charge notamment au niveau des symptômes douloureux.

Arthrose

Dégénérescence du cartilage articulaire associée à des anormalités osseuses. Peu ou pas de cellules inflammatoires en analyses biologiques

Arthrose Iaire

Arthrose II^{aire} Causée par une

Idiopathique ou spontanée : pas de ause spécifique le plus souvent liée à l'âge

lésion antérieure au niveau d'une articulation affectée. Peut se développer chez les jeunes adultes.

Arthrite inflammatoire

> Spondylite ankylosante

Cristalline

Pseudo Goutte

> Goutte

Inflammation chronique notamment au niveau articulaire mais communément associée à des symptômes systémiques

Séropositive Séronégative

Arthrite rhumatoïde > Arthrite rhumatoïde séropositive séronégative

► Lupus

Sclérodermie

Vascularite

Arthrite réactionnelle
Arthrite psoriasique

de l'intestin

Syndrome de Sjögren > Arthrite associée à une maladie inflammatoire

Arthrite septique

Développement d'un germe bactérien au niveau articulaire

Figure I : Classification des différents types d'arthrite

L'arthrite englobe plus d'une centaine d'affections différentes et de gravité variable. Il existe, à l'heure actuelle, différentes classifications incluant ou excluant les arthrites non inflammatoires comme l'arthrose. Ce schéma présente les formes les plus communes d'arthrite qui peuvent se répartir en trois grandes catégories : (1) l'arthrose (généralement décrite comme une arthrite non inflammatoire), (2) l'arthrite inflammatoire et (3) l'arthrite septique. L'arthrose est parfois exclue de cette classification mais l'existence d'arthroses inflammatoires nous a amené à choisir de présenter une classification comprenant l'arthrose comme sous-type d'arthrite (Arthrite foundation) (adaptée de **Gladman, 2008 ; IFAA, 2009**).

II. Généralités sur la polyarthrite rhumatoïde

1. Description générale

Historiquement, la première description de ce qu'on appelle aujourd'hui la polyarthrite rhumatoïde (PR) a été faite par le chirurgien français Augustin Landré-Beauvais dans sa thèse soutenue en 1800 sous le nom de « goutte asthénique primitive ». Et ce n'est qu'en 1858 que le nom de *rheumatoid arthritis* a été introduit par le médecin anglais Alfred Baring Garrod. De nos jours, la PR est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. C'est une pathologie auto-immune non spécifique et systémique qui évolue par poussées à intervalle variable. Elle fait partie des arthrites inflammatoires et est généralement subdivisée en deux sous-types : la PR séropositive et la PR séronégative pour le facteur rhumatoïde (FR) et/ou les autoanticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) (**Figure 1**). Cette pathologie affecte en premier lieu les articulations diarthrodiales particulièrement les poignets, les mains, les coudes, les épaules et les genoux. Ces dernières sont examinées pour évaluer l'activité de la pathologie (*i.e.* DAS28). Mais elle peut aussi atteindre d'autres articulations comme celles du cou, du pied ou des orteils. Contrairement à une monoarthrite (MoAr) qui n'affecte qu'une articulation, la polyarthrite affecte plusieurs articulations et généralement avec symétrie.



Figure 2 : Schéma comparatif d'une articulation normale et d'une articulation arthritique au stade symptomatique

(A) Une articulation normale est constituée de différentes structures dont : une capsule articulaire, c'est-à-dire une enveloppe fibreuse et élastique entourant et délimitant les articulations mobiles et une membrane synoviale qui tapisse la face interne de la capsule des articulations mobiles et qui est constituée de synoviocytes. Ces derniers sont à l'origine de la synthèse du liquide synovial qui a pour fonction de nourrir et de lubrifier les surfaces articulaires. L'articulation comprend aussi le cartilage articulaire qui assure la mobilité articulaire, transmet et réparti harmonieusement les charges lors du mouvement. Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif constitué d'un seul type cellulaire : les chondrocytes qui synthétisent une matrice extracellulaire dense composée principalement de collagène, d'acide hyaluronique et de protéoglycanes. (B) Lors d'une arthrite inflammatoire comme l'arthrite rhumatoïde, la membrane synoviale devient hyperplasique et est infiltrée par des cellules inflammatoires. A un stade plus avancé de la pathologie, on retrouve un épaississement de la membrane synoviale appelé pannus synovial qui migrera à l'intérieur du cartilage articulaire et dans l'os sous-jacent en les détruisant progressivement (adaptée de **Strand et al., 2007**).

Malgré l'hypothèse d'un déclenchement de la réaction auto-immune en dehors de l'articulation (voir CHAPITRE 1 : III. 1), les manifestations symptomatiques, elles, débutent au niveau articulaire et atteignent le tissu conjonctif, les muscles, les tendons et le tissu fibreux ainsi que l'os et le cartilage sous-jacents (pour plus de détails voir la **Figure 2** et sa légende ainsi que le CHAPITRE 1 : III.).

Outre les atteintes au niveau articulaire, la PR se caractérise par des manifestations extraarticulaires chez environ 50% des patients. Parmi les plus communes, on retrouve la formation de nodules rhumatoïdes (dans 30% des cas), la tuméfaction des vaisseaux lymphatiques, la présence d'une pleurite (5 à 10% des patients) mais aussi des affections au niveau du système cardiovasculaire (e.g. myocardite, péricardite, arythmie...) ou encore des manifestations oculaires (Das and Padhan, 2017).

2. Epidémiologie

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence de la PR varie entre 0,3% et 1% dans les pays industrialisés (WHO, 2003). D'une manière générale, les données actuelles concernant la prévalence de la PR sont fortement fluctuantes (Minichiello, Semerano and Boissier, 2017). Dans une étude récente, la prévalence mondiale globale ajustée à l'âge, en 2010, a été estimée à 0,24% [IC95% : 0,23% à 0,25%] et apparait fortement variable en fonction des régions géographiques, avec l'existence d'un gradient Nord-Sud et d'une hétérogénéité inter-régionale. Par exemple, la prévalence est de 0,46% [IC95% : 0,3% à 0,7%] pour la région australienne, de 0,44% [IC95% : 0,4% à 0,5%] pour l'Europe de l'ouest et l'Amérique du nord alors qu'elle n'est que de 0,16% [IC95% : 0,14% à 0,19%] pour la région nord-africaine (Cross et al., 2014). Il existe des exceptions avec une forte prévalence chez les Indiens Pima (5,3%) et chez les Indiens Chippewa (6,8%). La PR est entre deux à cinq fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. Par exemple, en France, la prévalence de la PR est estimée à 0,51% chez la femme et 0,09% chez l'homme (Guillemin et al., 2005). Quoi qu'il en soit, une donnée reste stable sur l'ensemble du globe, c'est l'augmentation de la prévalence avec l'âge (**Tableau I**) (Cross et al., 2014; Rudan et al., 2015).

Age (années)	Prévalence (%)	Borne inférieure de l'IC (%)	Borne supérieure de l'IC (%)	Tableau I : Prévalence globale de la PR pour tous les âges puis par
Tous les âges	0,24	0,23	0,25	tranche d'âge à partir de 55 ans
55 - 64	0,53	0,51	0,55	Etude montrant une prévalence multipliée par 5 entre la prévalence
65 – 74	0,78	0,75	0,82	globale et la prévalence à l'âge de 85 ans (d'après Global Burden of Disease,
75 – 84	١,06	1,01	1,11	2015).
85 et plus	1,35	1,28	1,43	

3. Etiologie

3.1. Génétique

L'existence d'une prédisposition génétique dans la PR a été mise en exergue suite à l'observation d'une agrégation familiale de la pathologie et de l'étude de concordance chez les jumeaux monozygotes et dizygotes. L'héritabilité de la PR est estimée entre 40 et 50% pour les PR-ACPA⁺ et entre 20 et 30% pour les PR-ACPA⁻ (Frisell *et al.*, 2013; Frisell, Saevarsdottir and Askling, 2016). De nombreuses études ont permis d'identifier des gènes de susceptibilité de la PR. Parmi eux, le plus connu est le locus *HLA* mais il existe d'autres facteurs génétiques non-HLA dans la prédisposition à la PR qui seront décrits dans cette partie (Viatte and Barton, 2017).

3.1.1 Locus HLA

Chez l'Homme, le lien entre le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), aussi appelé région des antigènes de leucocytes humains (HLA), et la PR a été proposé dès les années 1970s (McMichael et al., 1977; Stastny, 1978). Les gènes HLA sont localisés au niveau du bras court du chromosome 6 et constituent une région génique extrêmement polymorphe, avec par exemple plus de 1900 allèles pour le gène HLA-DRB1 (Viatte and Barton, 2017). Ce dernier, constitue le gène majeur de susceptibilité de la PR mais chacun de ses allèles ne représentent pas un risque en tant que tel. En 1987, Gregersen émet l'hypothèse de l'épitope partagé ou shared epitope (SE) (Gregersen, Silver and Winchester, 1987). Celle-ci repose sur l'existence d'un motif ou séquence de 5 acides aminés (QKRAA ou QRRAA ou RRRAA) en position 70-74 au niveau de la troisième région hypervariable de la chaîne DR^β1 du gène *HLA-DRB*1 similaire entre différents allèles : *HLA-DRB*1*01, *04, *10, *14. La présence de ces allèles prédispose à une PR sévère associée à la production d'ACPA. Mais la présence du SE ne constitue pas l'association génétique la plus forte. En effet, ce sont les acides aminés présents en position 11 ou une histidine en position 13 au niveau du gène HLA-DRB1 qui sont le plus fortement associés au développement d'une PR (Raychaudhuri et al., 2012; Ling et al., 2016). Plus récemment, il a été montré que la présence d'autres allèles HLA-DRB1 (e.g. HLA-DRB1*03, *07, *11 et *13) protège contre la PR dans différentes populations (Angelotti et al., 2017; Konda Mohan et al., 2017).

Les PR-ACPA⁺ et PR-ACPA⁻ présentent des profils de susceptibilité génétique distincts. La présence du SE n'est pas considérée comme un facteur de risque de PR pour les ACPA⁻, par contre l'acide aminé en position 11 du gène *HLA-DRB1* représente une susceptibilité dans les deux types de PR (*i.e.* ACPA⁻ et ACPA⁺). Cependant, malgré un lien certain, les allèles de susceptibilité *HLA* ne sont ni indispensables ni suffisants au développement de la PR.

3.1.2 Loci non-HLA

En 2017, le nombre total de gènes non-*HLA* associé à un risque de PR s'élevait à 106 pour la PR-ACPA⁺ (Viatte and Barton, 2017). Une méga-méta-analyse trans-ethnique des bases de données mondiales d'études d'association génétique pangénomiques (GWAS pour *Genome-Wide Association Study*) a notamment participé à leur caractérisation (Okada *et al.*, 2014). Les gènes (dont *HLA*) ayant les scores d'association les plus élevés sont présentés dans le **Tableau 2** ci-dessous, généré grâce à la base de données DisGeNET (*i.e.* base de données centrée sur les pathologies et les gènes associés englobant les résultats de multiples autres bases de données) et sont retrouvés dans plusieurs publications (Dieudé and Cornélis, 2005; Angelotti *et al.*, 2017; Viatte and Barton, 2017).

Gène	Nom	Score	Tableau 2 : Les 10 principaux gènes de suscentibilité pour le développement
PTPN22	Protéine tyrosine phosphate non-récepteur de type 22	0,567	d'une PR
TNF	Facteur de nécrose tumorale	0,506	Liste des 10 gènes ayant les scores DisGeNE les plus élevés pour la susceptibilité à la PR. Pour simplifier les analyses, DisGeNET calcu un score pour classifier chaque « associatio gène-pathologie » prenant en compte le nombr de sources reportant l'association d'intérêt, type de conservation de chacune des source les modèles animaux où l'association a été tétudiée et le nombre de publications présentar cette association (Piñero et al., 201 (<u>http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/men</u> /search?1, accès le 30 juillet 2018).
HLA-DR61	Antigènes de leucocytes humains-DRβI	0,44	
ILI-B	Interleukine I β	0,323	
CRP	Protéine-C réactive	0,315	
CTLA4	Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques	0,299	
PADI4	Peptidylarginine déiminase 4	0,298	
IL6	Interleukine 6	0,297	
MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase	0,287	
IL10	Interleukine 10	0,286	

Mais la majorité des variants de susceptibilité à la PR sont des variants génétiques (*i.e.* polymorphismes nucléotidiques ou SNPs) affectant des séquences non-codantes avec des scores plus élevés que les gènes codant présentés en amont (*e.g.* SNPs : rs2476601, variant anti-sens avec un score de 0,85 et rs6920220, variant intronique avec un score de 0,678). Ces variants exerceraient leurs effets *via* un déséquilibre de liaison avec le gène causal ou *via* des séquences d'ADN modulatrices (*e.g. enhancers*) (Viatte and Barton, 2017; DisGeNET).

3.2. Epigénétique

Malgré une contribution génétique indéniable dans la PR, des discordances ont été mises en exergue chez des jumeaux monozygotes PR soulignant un rôle de l'environnement et du comportement de l'individu dans la PR. Or, la relation entre l'environnement et la génétique peut être médiée par des marques épigénétiques. Effectivement, l'épigénétique est connue pour moduler l'expression génique en fonction du contexte sans altération de la séquence primaire de l'ADN et intervient dans la physiopathologie de la PR. Ceci, par plusieurs mécanismes épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN, la méthylation ou l'acétylation des histones et l'expression des microARNs (Richez *et al.*, 2017).

3.2.1 *Méthylation de l'ADN*

D'une manière générale, la méthylation de l'ADN est un phénomène plastique qui évolue dans le temps et en contexte pathologique. Elle permet de moduler l'expression génique (répression ou activation transcriptionnelle) et son action varie en fonction de la région génique hyper ou hypo méthylée.

Plusieurs études ont pu mettre en évidence des profils de méthylation variables entre des patients PR et des sujets sains dans plusieurs types cellulaires. Il a été montré, par exemple, que les fibroblastes synoviaux (fibroblast-like synoviocytes ou FLS) présentent des signatures d'hypométhylation ou d'hyperméthylation au niveau de leurs gènes impliqués dans les processus d'adhésion cellulaire, dans l'inflammation, dans les voies de signalisation cellulaires ou dans certaines fonctions immunitaires (Karouzakis et al., 2011; Nakano et al., 2013; Ai et al., 2015). Ces FLS sont largement étudiés dans la PR car ils vont acquérir un phénotype agressif, formeront le pannus synovial et participeront à la fois à la propagation de l'inflammation articulaire et à la dégradation du cartilage (Doody, Bottini and Firestein, 2017). L'observation des profils de méthylation dans d'autres types cellulaires a pu, entre autres, dévoiler une hypométhylation des cytosines des cellules T ou celles des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Bottini and Firestein, 2013). Outre les variations intercellulaires, l'étude des méthylomes (i.e. ensemble des modifications de l'état de méthylation du génome) a mis en avant des différences en fonction de l'articulation en question (Ai et al., 2016). Par exemple, lorsque sont comparés les profils de méthylation de l'ADN dans les FLS au niveau du genou par rapport à ceux de l'épaule, certains gènes à homéoboîtes (*i.e.* gènes HOX, important durant le développement, qui définissent les différentes parties du corps) ou certains gènes de la famille Wnt (*i.e.* gènes clefs durant l'embryogenèse et dans l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte) présentent des profils variables qui pourraient expliquer la mise en place de mécanismes distincts entre ces articulations et par conséquent une réponse différente au traitement (Ai et al., 2016; Hammaker and Firestein, 2018).

3.2.2 Acétylation ou désacétylation des histones

L'acétylation ou la désacétylation des histones sont elles aussi des marques épigénétiques intervenant dans la physiopathologie de la PR. Par exemple, l'utilisation d'un pan inhibiteur des histones désacétylases (HDAC) de classes I et II comme le Givinostat va réduire la concentration en cytokines pro-inflammatoires dans les FLS isolés de patients PR (Grabiec *et al.*, 2012). En outre, les traitements de fonds de la PR utilisés sont capables de moduler le ratio HAT/HDAC appuyant cette hypothèse.

3.2.3 MicroARNs

Les microARNs ou miARNs sont des ARNs non codants de 22-23 nucléotides capables de moduler l'expression génique et sont donc impliqués dans de nombreux processus biologiques et pathologiques. Dans la PR, certains miARNs présentent des profils d'expression aberrants. Une étude récente montre qu'environ 380 miARNs sont différentiellement exprimés dans les FLS de patients PR comparés à des FLS de patients arthrosiques (Mu *et al.*, 2016). On peut citer le miR-10a, impliqué dans l'inhibition de l'expression des interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8, respectivement), des métalloprotéases matricielles 1 et 3 (MMP1 et MMP3, respectivement) et dans la diminution de la prolifération, la migration et l'invasion des FLS, qui voit son expression significativement diminuée dans les FLS ou le tissu synovial de patients PR. Cette diminution pourrait impliquer des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumoral (TNF) ou l'IL-1 β via la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa B (NFkB). Un autre exemple de miARN dont l'expression est diminuée dans la PR est le miR-27a. Son action passe par l'expression des MMP2, MMP9 et MMP13 impliquées dans la migration et l'invasion des FLS. Les microARNs ne sont pas tous sous-exprimés dans le cas d'une PR. Le miR-34a, par exemple, est surexprimé dans les FLS de patients PR et bloquer ce miARN conduit à une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Hammaker and Firestein, 2018).

3.3. Environnementale

3.3.1 *Cigarette*

L'exposition active à la fumée de cigarette constitue le risque environnemental le plus important associé à une PR. Celui-ci serait multiplié par deux par rapport à des non-fumeurs (Chang *et al.*, 2014). L'exposition passive prolongée notamment dans l'enfance pourrait, elle aussi, accroitre le risque de PR chez les fumeurs (Seror *et al.*, 2017). La probabilité de développer une PR est augmentée à la fois par la durée et l'intensité du tabagisme avec une influence plus importante de la durée du tabagisme (Costenbader *et al.*, 2006; Di Giuseppe *et al.*, 2013; Hedström *et al.*, 2018). Celle-ci ne semble être réduite qu'après 10 ans (Stolt *et al.*, 2003), 15 ans (Di Giuseppe *et al.*, 2013) voir 20 ans (Costenbader *et al.*, 2006) d'arrêt du tabac. Pour une exposition inférieure à 10 ans, il n'existe pas d'association significative entre tabagisme et risque de PR (Källberg, Ding, Padyukov, Bengtsson, Rönnelid, Klareskog, Alfredsson and E. study EIRA Study Group, 2011) mais ces résultats restent controversés. Dans les deux sexes, le risque associé à la cigarette est plus élevé pour les PR séropositives (FR et/ou ACPA) que pour les PR séronégatives et augmente avec certaines prédispositions génétiques telle que la présence d'une ou deux copies de l'épitope partagé (Stolt *et al.*, 2003; Padyukov *et al.*, 2004; Källberg, Ding, Padyukov, Bengtsson, Rönnelid, Klareskog, Alfredsson, Rönnelid, Klareskog, Alfredsson and EIRA Study Group, 2011).

Les mécanismes par lesquels le tabagisme est associé à un risque de PR sont multiples et ne sont pas tous encore connus. Mais les différents constituants toxiques de la cigarette (arsenic, formaldéhyde,
benzène, naphtalène, …) ont la capacité d'interagir avec certains processus biologiques. Par exemple, ils peuvent constituer une source importance de radicaux libres, capables d'induire un stress oxydatif chez l'individu. De plus, la cigarette module à long terme les réponses immunitaires innée et acquise. La cigarette pourrait induire une inflammation pulmonaire locale entrainant une augmentation de la production des enzymes impliquées dans la citrullination (*i.e.* les peptidylarginine déiminases ou PADs) et par conséquent augmenter le taux de protéines citrullinées au niveau des macrophages pulmonaires. Ainsi, l'hypercitrullination locale pourrait participer à la rupture de tolérance (voir CHAPITRE 1 : III. 1) (Catrina et al., 2014; Richez et al., 2017).

3.3.2 Microbiote

Outre l'exposition à la cigarette, plusieurs études ont montré une altération de la composition du microbiote oral et intestinal chez les patients arthritiques et ceci précocement dans la pathologie (**Tableau 3**) (Vaahtovuo *et al.*, 2008; Gul'neva and Noskov, 2011; Liu *et al.*, 2013; Scher *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

Groupe d'étude	Echantillon	Pays	Technique employée	Taxonomie bactérienne (↓ diminuée,↑enrichie)	Référence bibliographique
PR précoce (51) vs Fibromyalgie (50)	Selles	Finlande	Hybridation ARNr 16S, marquage de l'ADN et cytométrie en flux	↓ Bifidobacteria, ↓ Bacteroides- Porphyromonas-Prevotella, ↓ Bacteroides fragilis, ↓ Clostridium coccoides	Vaahtovuo <i>et al.</i> , 2008
PR non traitée (94) vs Sain (97)	Selles, Dent, Salive	Russe	Séquençage aléatoire métagénomique	 ↑ Lactobacillus salivarius, ↑ Gordonibacter pamelaeae, ↑ Clostridium asparagiforme, , ↓ Haemophilus spp. 	Gul'neva <i>et al.</i> , 2011
PR précoce (15) vs Sain (15)	Selles	Chine	PCR quantitative en temps réel	1 Lactobacillus	Liu et al., 2013
PR nouvellement diagnostiquée (44) vs Sain (28)	Selles	Etats-Unis	Gène ARNr 16S et séquençage WGS	↑ Prevotella copri, ↓ Bacteroides	Scher et al., 2013
PR non traitée (77) vs PR traitée (21) vs Sain (80)	Selles	Chine	Gène ARNr 16S et séquençage WGS	↑ Enterococci, ↑ Clostridia, ↑ Colibacteria, ↓ Lactobacteria	Zhang et <i>al.,</i> 2015

Tableau 3 : Altération du microbiote et polyarthrite rhumatoïde

De nombreuses études se sont intéressées au rôle du microbiote dans le développement de la PR. Quelques exemples d'études sont présentés dans ce tableau sur différents types d'échantillons, de régions géographiques distinctes avec des techniques d'analyses variables.

Malgré certains résultats controversés, il est connu que le microbiote (*i.e.* ensemble de la communauté microbienne [bactéries, virus, parasites et champignons] présent au sein d'un environnement donné) constitue un modulateur de la réponse immunitaire (innée ou adaptative) et par conséquent, une dysbiose (*i.e.* perturbation de la composition du microbiote) est capable de

moduler l'équilibre entre inflammation et tolérance en condition pathologique. Dans la PR, on peut notamment observer : une diminution de l'abondance relative des bactéries des genres Bifidobacterium et Bacteroides et, à contrario, une abondance relative augmentée des bactéries des genres Prevotella et Lactobacillus. Ce déséquilibre entre bactéries bénéfiques et délétères pour l'hôte peut conduire, par exemple, au développement d'une inflammation locale (e.g. par la modulation de la perméabilité intestinale favorisant l'entrée de molécules antigéniques) ou une altération de la réponse immunitaire systémique de l'organisme. Ainsi, le microbiote pourrait avoir un impact dans l'initiation de la PR en participant à la rupture de tolérance (voir CHAPITRE 1 : III. 1) et/ou dans la progression de la pathologie en modulant la réponse immune. De manière intéressante, une étude de Wegner a mis en évidence un rôle des *Porphyromonas gingivalis* dans la citrullination aberrante des protéines au niveau de la muqueuse buccale (Wegner et al., 2010) qui pourrait participer à la rupture de tolérance et à l'initiation de la PR. Toutefois, à l'heure actuelle, il existe une forte variabilité géographique des populations étudiées et les effectifs dans la plupart des études mettant en relation le microbiote et la PR sont considérés comme trop faibles. C'est pourquoi, de nouvelles études plus globales permettront de valider ces résultats. De plus, des études portant sur l'apport de probiotiques montrent des résultats controversés. On observe, d'une part, une augmentation de la réponse inflammatoire dans la PR avec par exemple, la prise journalière de 108 Lactobacillus casei 01 chez l'Homme (Vaghef-Mehrabany et al., 2014) et d'autre part, une amélioration des symptômes comme dans une étude récente de Lee, avec l'utilisation d'une combinaison de probiotiques (complexes de Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, zinc et co-enzyme Q10) capable d'induire une activité antiinflammatoire dans un modèle d'arthrite murin (Lee et al., 2018). Enfin, la séquence temporelle entre le développement d'une dysbiose et le développement de la PR n'est pas connue et ne permet pas de déterminer le lien de cause à effet.

3.4. Immunologique – NETose et autophagie

Les neutrophiles activés sont capables de former des filaments extracellulaires composés d'ADN, d'histones et de protéines appelés pièges extracellulaires des neurotrophiles ou *neutrophil extracellular traps* (NETs) (**Figure 3**). La formation de NETs entraine la lyse du neutrophile et cette mort cellulaire est appelée NETose.



Figure 3: Micrographie d'imagerie électronique illustrant la formation de NETs

La formation de NETs a été induite par l'ajout de phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) au niveau de granulocytes polymorphonucléaires d'une population contrôle (photo de gauche) et d'une population polyarthritique (photo de droite). Le PMA active de manière directe la protéine kinase C (PKC) qui activera les voies de signalisation MEK/ERK connues pour favoriser la formation de NETs. Ces images montrent aussi une réponse plus importante des granulocytes issus de patients PR que de patients contrôles (d'après **Sur Chowdhury et al., 2014**). La NETose semble jouer un rôle dans les mécanismes physiopathologiques de plusieurs pathologies auto-immunes, dont la PR, en modifiant l'exposition des autoantigènes au système immunitaire et en participant à la rupture de tolérance. L'une des hypothèses repose sur la présence d'antigènes cibles des ACPA produits dans la PR au niveau des NETs qui participe à la synthèse des ACPA dans les synoviales rhumatoïdes (Khandpur *et al.*, 2013; Sur Chowdhury *et al.*, 2014; Berthelot *et al.*, 2017; Demoruelle *et al.*, 2017).

Outre la NETose, l'autophagie semble jouer un rôle dans la progression pathologique de la PR. En effet, le taux d'autophagie est augmenté dans les cellules T CD4⁺ des patients polyarthritiques entrainant une perte de leur homéostasie et une augmentation de leur résistance à l'apoptose ce qui pourrait promouvoir la PR (van Loosdregt *et al.*, 2016).

3.5. Hormonale

Les données épidémiologiques montrent que la PR est entre deux à cinq fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme (Cross *et al.*, 2014), laissant supposer une implication hormonale dans le déclenchement de la pathologie. D'autre part, la grossesse possède un effet protecteur à la fois sur le déclenchement et l'activité de la PR. En effet, durant la grossesse, les taux circulants des hormones placentaires stéroïdiennes (*i.e.* œstrogènes, progestérone et cortisol) pourraient supprimer directement ou indirectement l'inflammation synoviale en inhibant le système immunitaire maternel et induire une tolérance immune (Hughes and Choubey, 2014). Juste après la naissance, le risque de PR est augmenté chez la mère durant les 3 premiers mois et diminue durant les 9 mois suivants. On peut aussi noter que la PR se présente le plus souvent après la ménopause et qu'une ménopause à un âge jeune augmente le risque de PR (Alpízar-Rodríguez *et al.*, 2016). Par contre, à l'heure d'aujourd'hui, aucune étude pertinente n'a pu montrer de lien significatif entre la prise d'un contraceptif hormonal oral ou d'une thérapie de remplacement hormonale et le développement d'une PR (Alpízar-Rodríguez *et al.*, 2016). Les résultats quant aux rôles protecteur ou de facteur de risque dans la PR des hormones restent controversées car ils sont fortement dépendants de chacune des phases de la vie d'une femme ainsi que des phases de la pathologie.

3.6. Psychologique

Les facteurs psychologiques dans la PR semblent participer à l'évolution de la pathologie mais ne semble pas constituer un risque pour développer une PR en tant que tel. La dépression est plus fréquente chez les patients PR (avec une prévalence comprise entre 14 à 48% en fonction des études) et est associée à une augmentation de la douleur ressentie, du stress et de la fatigue conduisant à une diminution de la qualité de vie des patients. La PR est aussi connue pour augmenter l'anxiété chez les patients (Matcham *et al.*, 2013; Sturgeon, Finan and Zautra, 2016).

4. Evaluation et diagnostique

4.1. Diagnostic de la PR

Avant 2010, le diagnostic de la PR était basé sur un ensemble de critères établis par le Collège Américain de Rhumatologie datant de 1987 (**Tableau 4**) (Arnett *et al.*, 1988). Mais ces critères étaient critiqués pour leur manque de spécificité, principalement pour des PR précoces. C'est pourquoi, en 2010, de nouveaux critères ont été proposés par l'ACR et la ligue européenne contre les rhumatismes (EULAR) présentés dans le **Tableau 5** (Aletaha *et al.*, 2010) afin de diagnostiquer la PR de manière plus précoce et par conséquent d'augmenter les chances d'efficacité thérapeutique en se trouvant dans la « fenêtre d'opportunité thérapeutique » (voir CHAPITRE 1 : IV. 2.5). Il reste à noter que ces critères ne sont applicables que chez des personnes avec au moins une synovite clinique au niveau d'une articulation.

I. Raideur articulaire matinale : raideur matinale articulaire ou périarticulaire, durant au moins une heure avant l'amélioration maximale.

2. Arthrite d'au moins 3 groupes articulaires : gonflement des tissus mous ou épanchement (et non pas saillie osseuse isolée) d'au moins 3 groupes articulaires touchés simultanément, observés par un médecin. Les 14 groupes possibles sont, à droite ou à gauche, les IPP (interphalangiennes proximales), les MCP (métacarpophalangiennes), les poignets, les coudes, les genoux, les chevilles et les MTP (métatarso-phalangiennes).

3. Arthrite des articulations des mains : gonflement d'au moins un groupe articulaire (voir définition en 2) parmi poignets, IPP ou MCP.

4. Arthrite symétrique : atteinte simultanée des mêmes groupes articulaires (voir définition en 2) des deux côtés du corps (l'atteinte bilatérale des IPP, des MCP, ou des MTP est acceptable sans symétrie absolue).

5. Nodules rhumatoïdes : nodules sous-cutanés, sur les proéminences osseuses, les surfaces d'extension, ou dans les régions para-articulaires, observés par un médecin.

6. Facteur rhumatoïde sérique mise en évidence de quantités anormales de facteur rhumatoïde sérique par une méthode dont les résultats sont positifs chez moins de 5 % des sujets témoins normaux.

7. Modifications radiologiques : modifications radiologiques typiques de la polyarthrite rhumatoïde sur les radiographies de face des mains et des poignets, avec obligatoirement des érosions ou une décalcification osseuse évidente localisée au niveau des articulations atteintes ou de façon plus nette dans les régions adjacentes à ces articulations (des modifications d'allure seulement arthrosique ne conviennent pas).

* Au moins 4 des 7 critères sont exigés

Les critères I à 4 doivent être présents depuis au moins 6 semaines

Tableau 4 : Critères diagnostics de la polyarthrite rhumatoïde de 1987

Ce tableau présente les critères diagnostics d'une PR établis par le collège américain de rhumatologie (d'après **Arnett et al., 1988**).

 $\textbf{IPP}: interphalangienne \ proximale, \ \textbf{MCP}: métacarpo-phalangienne, \ \textbf{MTP}: métatarso-phalangienne$

 Population cible : Au moins I articulation atteinte de synovite clinique (tuméfaction) Avec une synovite qui n'est pas expliquée par une autre maladie 	Score
Articulations atteintes I grosse articulation 2 à 10 grosses articulations (symétriques ou non) I à 3 petites articulations 4 à 10 petites articulations >10 articulations (dont au moins une petite)	0 2 3 5
Autoanticorps (FR et ACPA) FR- et ACPA- et/ou ACPA+ à faible taux (I à 3 x normale) FR+ et/ou ACPA+ à taux élevé (>3 x normale)	0 2 3
Durée d'évolution des synovites < 6 semaines ≥ 6 semaines	0 1
Marqueurs biologiques de l'inflammation (VS et CRP) VS et CRP normales VS et/ou CRP anormale	0 I

Tableau 5 : Critères diagnostics de l'ACR et de l'EULAR de 2010

Le diagnostic d'une polyarthrite rhumatoïde est établi lorsque le score obtenu est $\geq 6/10$. Les grosses articulations correspondent aux articulations des épaules, des coudes, des hanches, des genoux et des chevilles. Les petites articulations englobent les articulations métacarpo-phalangiennes, interphalangiennes proximales, métatarso-phalangiennes II à V, interphalangiennes du pouce et celles des poignets (**Aletaha et al., 2010**).

FR : facteur rhumatoïde, **ACPA** : autoanticorps dirigés contre les peptides citrullinés, **VS** : vitesse de sédimentation, **CRP** : protéine-C réactive

4.2. Bilan en imagerie

Les techniques d'imagerie sont utilisées dans le diagnostic et le suivi de la PR et répondent aux recommandations établies par L'EULAR et l'ACR en 2013 (Colebatch *et al.*, 2013).

4.2.1 Techniques d'exploration classiques chez l'Homme

Les techniques d'exploration dites classiques, chez l'Homme, font parties des techniques d'imagerie médicale conventionnelle appelée imagerie anatomique ou structurale. Elle regroupe la radiologie X (RX), la tomodensitométrie (*i.e.* scanner), l'échographie à ultrasons (US) et l'imagerie par résonnance magnétique (IRM). Pour la PR, les nouveaux critères diagnostic de 2010 prennent en considération le nombre de synovites cliniques (**Tableau 5**). Même si les RX constituent la technique d'imagerie de base pour le suivi de la PR, son utilisation ne permet pas une évaluation correcte des tissus mous articulaires et limite le diagnostic précoce. C'est pourquoi, en cas de doute dans le diagnostic d'une synovite, il est recommandé de réaliser une US ou une IRM pour l'évaluation plus précise d'une inflammation articulaire. En plus du diagnostic, l'US ou l'IRM peuvent être utilisées pour prédire la progression de la PR et aider à la prédiction de la réponse thérapeutique. Les recommandations actuelles mettent en avant l'importance d'un suivi évolutif par imagerie de la PR (Colebatch *et al.*, 2013; Zufferey and Becce, 2014).

4.2.2 Technique d'exploration fonctionnelle : l'imagerie scintigraphique

Contrairement aux techniques d'exploration anatomique qui permettent d'obtenir principalement des informations structurales, les techniques d'exploration fonctionnelle renseignent, en premier lieu, sur le fonctionnement des organes. Les grands types d'imagerie fonctionnelle sont : la scintigraphie ou tomographie d'émission mono-photonique (TEMP), l'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (IRMf) et la tomographie par émission de positons (TEP). Comme la PR se présente précocement par des changements moléculaires et cellulaires avant d'observer des variations anatomiques, la détection *in vivo* de ces processus biologiques tels que l'inflammation, les remodelages de l'os et du cartilage, peut être considérée comme une approche clef pour le diagnostic précoce et le suivi de la pathologie. Ainsi l'exploration fonctionnelle présente un intérêt indéniable dans le diagnostic précoce de la pathologie.

a. Principes de base de l'imagerie scintigraphique

Parmi les techniques d'imagerie fonctionnelle, l'imagerie scintigraphique repose sur la mesure de la radioactivité (*i.e.* phénomène physique, naturel, au cours duquel des noyaux atomiques instables se désintègrent spontanément en noyaux stables, en dégageant de l'énergie sous forme de rayonnement, découverte en 1898 par H. Becquerel). Elle permet de visualiser le fonctionnement d'un organe (*e.g.* cœur, poumons, reins, vessie, organes digestifs, squelette, tyroïde...) ou de tracer un

métabolisme ou une fonction biologique particulière. L'isotope le plus utilisé en médecine nucléaire est le technétium-99 métastable (^{99m}-Tc) (voir encadré). Il est complexé de manière stable à des molécules capables de fixer un élément biologique particulier (*e.g.* les diphosphonates).



Le principe d'un examen scintigraphique est expliqué en **Figure 4**.



Figure 4 : Principe de la scintigraphie

Lors d'un examen scintigraphique, un radiopharmaceutique (e.g. des molécules marquées au technétium 99m le plus souvent ou des noyaux radioactifs comme l'lode 123) est injecté en faible quantité par voie intraveineuse et va se distribuer chez le sujet selon son métabolisme, normal ou pathologique. Ensuite, la détection des photons gamma émis par le traceur va se faire grâce à une gamma caméra et plus précisément grâce au cristal d'iodure de sodium (Nal) qui transformera l'énergie des photons gamma ayant traversés le collimateur en photons lumineux. La conversion des photons lumineux en signaux électriques suivie d'une amplification se fera grâce au photomultiplicateur. Enfin, l'électronique de comptage permettra une quantification du signal (**Paycha and Richard, 2001**).

Nal : lodure de Sodium

L'exploration scintigraphique semble plus performante que l'examen clinique classique pour les destructions articulaires (Colebatch *et al.*, 2013) et possède plusieurs avantages :

- 1. donner des informations fonctionnelles et métaboliques
- 2. l'examen est sensible et précoce
- 3. l'imagerie peut se faire sur le corps entier en un seul examen
- 4. l'examen est non invasif et peu irradiant

b. Utilisation des biphosphonates

L'exploration scintigraphique du squelette utilise des biphosphonates marqués au technétium 99m (^{99m}Tc). Les plus utilisés sont : le méthylène diphosphonate (MDP), l'hydroxyméthylène diphosphonate (HMDP), l'hydroxyéthylène diphosphonate (HDP) et le 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonate (DPD) (Van den Wyngaert *et al.*, 2016). Les arthrites inflammatoires sont caractérisées par une hyperfixation de ces radiomarqueurs notamment le HMDP au niveau des articulations concernées qui peut être très intense au moment des poussées inflammatoires (Paycha and Richard, 2001; Kim *et al.*, 2014). Un exemple de scintigraphie osseuse chez une patiente PR est présenté en **Figure 5**.



Figure 5 : Scintigraphie osseuse d'une patiente polyarthritique

(A) Images d'exploration scintigraphique avec le ^{99m}Tc-HDP enregistrées immédiatement après l'injection i.v. du radiotraceur correspondant à l'arrivée vasculaire du radiotraceur au niveau des régions pathologiques. On peut voir une augmentation de l'assimilation du radiotraceur au niveau de plusieurs articulations IPP et IP au niveau des mains et des articulations MTP au niveau du pied. La phase suivante est une phase tissulaire où le traceur a diffusé dans les différents tissus. Cette phase n'est pas illustrée ici (**Paycha and Richard, 2001**).

(**B**) La scintigraphie osseuse à proprement parler nécessite un délai de 2 à 4 heures et permet un bon contraste entre ce qui est fixé au niveau du squelette et l'activité qui reste présente dans les tissus mous. On peut voir une hyperfixation du radiotraceur ^{99m}Tc-HDP au niveau péri-articulaire des mêmes articulations que celles vues en A mais avec un contraste supérieur (**Kim et al., 2014**).

IPP : interphalangienne proximale ; **IP** : interphalangienne ; **MTP** : métatarso-phalangienne

c. Utilisation du NTP-15-5 comme marqueur précoce du remodelage du cartilage

La PR est caractérisée par une perte précoce de l'intégrité de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage articulaire, se traduisant par un remodelage de celui-ci. Concernant l'intégrité du cartilage, plusieurs études ont démontré la spécificité d'accumulation du traceur radioactif ^{99m}Tc-NTP 15-5 au niveau des protéoglycanes du cartilage articulaire de différents modèles animaux et de prélèvements articulaires humains et ont montré l'intérêt d'utiliser ce radiomarqueur pour l'imagerie fonctionnelle du cartilage (Miot-Noirault *et al.*, 2007a, 2008).

Ce ^{99m}Tc-NTP 15-5 ou *N*-(triethylammonium)-3-propyl-[15]ane-N5 marqué au technétium 99m correspond à un agent bifonctionnel constitué d'une fonction ammonium quaternaire capable de lier les protéoglycanes du cartilage et d'une structure polyazamacrocyclique permettant la complexation au ^{99m}Tc qui sert de radiomarqueur (**Figure 6**).



Figure 6 : Structure chimique du ^{99m}Tc-NTP 15-5

Structure chimique du N-(triethylammonium)-3-propyl-[15]ane-N5 : agent bifonctionnel contenant une fonction ammonium quaternaire et une structure polyazamacrocyclique permettant la complexation au ^{99m}Tc (d'après **Miot-Noirault et al., 2007b**).

Des études *ex vivo* au niveau du cartilage humain ont pu montrer une excellente spécificité du ^{99m}Tc-NTP 15-5 pour les protéoglycanes du cartilage (Cachin *et al.*, 2011) et son utilisation pour le suivi précoce du remodelage du cartilage par imagerie scintigraphique *in vivo* a été validée récemment dans un modèle murin de monoarthrite induite au CFA (A. Khairnar *et al.*, 2015). Ainsi, ce radiotraceur pourrait permettre un diagnostic précoce du remodelage du cartilage dans les pathologies ostéoarticulaires comme la PR.

4.3. Bilan biologique

4.3.1 Recherche du facteur rhumatoïde

C'est à la fin des années 1930s, à Oslo, que l'immunologiste E. Waaler a découvert, dans le sérum de patients polyarthritiques, l'existence d'un facteur capable de provoquer l'agglutination des globules rouges sensibilisés par un sérum immun. Quelques années plus tard, au laboratoire américain de Melvin Rose, le lien entre pouvoir agglutinant du sérum de patient PR et l'existence d'un « facteur activateur agglutinant » fut confirmé. En 1949, le terme de facteur rhumatoïde (FR) entra dans le langage médical. Ces recherches ont été à l'origine de l'un des premiers sérodiagnostics de la PR qui porte le nom de test de Waaler-Rose et qui utilise les propriétés du FR (auto-anticorps anti-IgG) à agglutiner des hématies recouvertes d'IgG à un titre suffisamment élevé (> 8 UI/ml). Outre ce test, la recherche du FR peut se faire grâce à la méthode de fixation au latex. Actuellement, ces deux techniques d'agglutination sur lame ne sont plus recommandées par la Haute Autorité de Santé. Elle préconise d'utiliser la néphélométrie ou le test immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) pour la recherche du FR au niveau sérique.

La fréquence de personnes positives pour le FR dans la population saine générale est comprise entre 1,3% et 4% chez les caucasiens et jusqu'à 30% dans certaines tribus indiennes d'Amérique du nord (Newkirk, 2002). De plus, le FR n'est pas spécifique de la PR car il est détecté dans de nombreuses autres conditions pathologiques (**Tableau 6**) (Ingegnoli, Castelli and Gualtierotti, 2013), d'où la détection d'autres autoanticorps pour aider au diagnostic. La séropositivité au FR s'élève entre 70% et 75% des patients polyarthritiques et sa spécificité est comprise entre 80% et 85% (Park *et al.*, 2015).

Pathologie	Fréquence (en %)			
Arthrite				
Arthrite rhumatoïde	70-90			
Arthrite juvénile idiopathique	5			
Arthrite psoriasis	<15			
Arthrite réactive	<5			
Autres pathologies du tissu conjonctif				
Syndrome primaire de Sjögren's	75-95			
Pathologie mixte du tissu conjonctif	50-60			
Lupus érythémateux disséminé	15-35			
Sclérose systémique	20-30			
Dermato-/polymyosite	20			
Vascularites systémiques	5-20			
Maladies infectieuses				
Infections bactériennes				
Endocardite bactérienne subaigüe	40			
Syphilis primaire-tertiaire	8-37			
Tuberculose	15			
Infections virales				
Infection par le virus Coxsackie	15			
Infection par le virus Dengue	10			
Infection par EBC et le CMV	20			
Infections aux virus de l'hépatite A, B et C	25			
Infection au HCV	40-76			
Infection par le virus de l'herpes	10-15			
Infection par le VIH	10-20			
Rougeole	8-15			
Infection par parvovirus	10			
Rubéole	15			
Infections parasitaires	1			
Chagas	15-25			
Malaria	15-18			
Onchocercose	10			
Toxoplasmose	10-12			
Autres Pathologies				
Cirrhose du foie	25			
Cirrhose biliaire primaire	45-70			
Malignité	5-25			
Après plusieurs immunisations	10-15			
Sarcoïdose chronique	5-30			
Personne saine de 50 ans	5			
Personne saine de 70 ans	10-25			

Tableau 6 : Fréquence du facteur rhumatoïde dans différentes conditions pathologiques

Tableau adapté d'**Ingegnoli, Castelli and Gualtierotti, 2013** présentant la fréquence en pourcentage du FR dans de multiples pathologies.

EBV : virus d'Epstein-Barr, CMV : cytomégalovirus, HCV : virus de l'hépatite C, VIH : virus de l'immunodéficience humaine

4.3.2 Recherche d'autoanticorps

Comme développé précédemment, nous avons pu voir que les critères diagnostics de la PR de l'ACR et l'EULAR de 2010 comprennent, outre le dosage du FR, le dosage d'autoanticorps et notamment des anticorps anti-peptides citrullinés qui sont produits plus précocement que le FR. Nous parlerons aussi d'autres types d'autoanticorps dont le dosage pourrait être pertinent particulièrement pour les PR séronégatives.

a. Autoanticorps anti-peptides citrullinés

Les autoanticorps anti-peptides citrullinés (ACPA ou anti-CCP) ont été décrits pour la première fois en 1964 par Nienhuis et Mandema sous le nom de facteurs antipérinucléaires (APF). Quelques années ont été nécessaires pour décrire les ACPA à proprement parler et pour préciser leur intérêt dans le diagnostic de la PR. L'historique des grandes découvertes et avancées dans la recherche sur les ACPA est présenté dans le **Tableau 7**.

Découverte et avancées	Substrats antigéniques	Technique employée	Auteurs / Année
Découverte du facteur antipérinucléaire (APF) dans le sérum de patients PR	Granules cytoplasmiques de kératohyaline entourant le noyau des cellules de la muqueuse buccale humaines	Immunofluorescence indirecte	Nienhuis & Mandema / 1964
Présence d'anticorps assimilés à des anticorps anti-kératine (AKA) dans le sérum de patients PR	Statum corneum de l'œsophage de rat	Immunofluorescence indirecte	Young et al. / 1979
Les APA et AKA sont des autoanticorps antifilagrine ($\ensuremath{AFA}\xspace)$	Profilagrine présente dans les épithéliums squameux stratifiés	Immunoblot	Sebbag et al. / 1995
Les résidus de citrulline présents sur la filagrine sont des constituants essentiels des épitopes reconnus par les autoanticorps anti-filagrine (AFA)	Peptides citrullinés	ELISA	Schellekens et al. / 1998

Tableau 7 : Historique de la recherche des autoanticorps anti-peptides citrullinés

Ce tableau récapitule les grandes découvertes et avancées concernant les autoanticorps anti-protéines citrullinées (adapté de **Bas, 2005 ; Humbel, 2009**).

APF : facteur antipérinucléaire, **AKA** : anticorps anti-kératine, **AFA** : autoanticorps anti-filagrine, **ELISA** : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

Les peptides et/ou protéines citrullinés sont marqués par une modification post-traductionnelle : la citrullination, aussi appelée la désimination, phénomène qui a été découvert au début des années 1970s. Cette réaction enzymatique est catalysée par des enzymes dépendantes du calcium appelées les peptidylarginine désiminases (PADs) qui transforment les résidus arginyl- (chargés positivement) en résidus citrullyl- (neutres) (**Figure 7**) (Méchin *et al.*, 2011).



Figure 7 : La réaction de citrullination ou désimination

La désimination est une modification posttraductionnelle qui permet la conversion d'un peptidylarginine en peptidylcitrulline (*i.e.* conversion du groupe guanidine de la chaine latérale de l'arginine en groupe uréido). Cette réaction est catalysée par des enzymes de type peptidylarginine désiminase (PAD I à 4 et 6 chez l'Homme) dépendantes du calcium (d'après **Potempa, Mydel and Koziel, 2017**).

Lorsque les taux calciques intracellulaires sont faibles, les PADs, présentes à l'intérieur des cellules, restent sous forme inactive. Suite à une mort cellulaire, la désintégration des membranes plasmiques ou de celles des organites entraine, d'une part, la libération des PADs mais aussi une augmentation importante des taux calciques extracellulaires. L'augmentation de calcium par ce mécanisme de mort cellulaire ou par d'autres processus (*e.g.* remodelage osseux) conduit alors, à une activation des PADs qui augmentent le taux de citrullination. Subséquemment, la citrullination des protéines augmente et celles-ci peuvent entrer en contact avec le système immunitaire environnant conduisant *in fine* à la production d'ACPA.

Les ACPA ciblent les résidus citrullines de différentes protéines comme la fibrine, le fibrinogène, la vimentine, le collagène de type I ou II, les protéoglycanes, l'α-énolase, les histones... ainsi que des composants microbiens comme les antigènes nucléaires du virus Epstein-Barr (EBNA-1) ou l'α-énolase de *Porphyromonas gingivalis* (Puszczewicz and Iwaszkiewicz, 2011; Sipilä *et al.*, 2017).

Plus spécifique que le dosage du FR dans le diagnostic de la PR, les tests ELISA de détection des ACPA utilisent des variants cycliques des peptides citrullinés nommés test de première ou de seconde génération (CCP1 et CCP2 respectivement) et plus récemment celui de troisième génération (CCP3). La sensibilité et la spécificité des tests ELISA ACPA varient en fonction du stade de la PR (**Figure 8**) (Musset and Ghillani-Dalbin, 2013).

Sensibilité et spécificité des anti-CCP					
	Sensibilité (%)	Spécificité (%)			
PR préclinique	34	98			
PR précoce (<6 mois)	58	94			
PR établie (>6 mois)	88	93			

Figure 8 : Sensibilité et spécificité des anticorps anti-peptides cycliques citrullinés

Les pourcentages des paramètres de sensibilité et de spécificité varient en fonction du stade de la PR, qu'elle soit préclinique : avant l'apparition des premiers symptômes, précoce : dans les 6 premiers mois après les premiers symptômes ou établie : 6 mois après les premiers symptômes (d'après **Musset and Ghillani-Dalbin, 2013**).

Malgré une très bonne spécificité de ces tests, les ACPA peuvent être détectés dans d'autres pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (13%), le syndrome de Gougerot-sjögren (3-8%) ou la sclérodermie systémique (10-15%). Nous pouvons aussi noter que la présence d'ACPA possède une valeur pronostique et ces autoanticorps sont, le plus souvent, associés à des formes sévères de PR (Sokolove and Pisetsky, 2016). Leur rôle dans la physiopathologie de la PR et notamment dans les symptômes douloureux dans la phase précoce de la pathologie sera plus largement développé dans une prochaine partie (voir CHAPITRE 2 : III. 1.1).

b. Anticorps anti-peptides carbamylés

La carbamylation (*i.e.* carbamoylation : terme chimiquement plus exact) ou homocitrullination est une modification post-traductionnelle non-enzymatique médiée par le cyanate dans laquelle une lysine est convertie en homocitrulline. Les anti-CarP sont présents à la fois dans les PR-ACPA- (IgG : 16%, IgA : 30%) et les PR-ACPA+ (IgG : 73%, IgA : 51%) et chez 40% des patients arthralgiques (pour la notion d'arthralgie voir le CHAPITRE 2 : III. 1) (Shi *et al.*, 2014). Le dosage des IgG anti-CarP constitue un biomarqueur de la PR avec une sensibilité proche de 45% et une spécificité égale à 97% (Shi *et al.*, 2011), son utilisation serait plus utile pour les PR-ACPA- mais les anti-CarP ne permettent pas, à eux-seuls, un diagnostic de la PR car ils sont aussi présents dans d'autres formes d'arthrite (*e.g.* arthrite réactive, spondylarthrite, arthrose) (Shi *et al.*, 2015).

c. Anticorps anti-malondialdéhyde-acétaldéhyde

Lorsque les tissus sont exposés à un taux élevé d'espèces oxygénées réactives, ils vont subir des mécanismes de peroxydation lipidique et des dommages cellulaires qui pourront conduire à la formation d'adduits protéiques dotés d'un rôle pro-inflammatoire. Les peroxydes lipidiques se décomposent en produits secondaires toxiques qui sont capables d'augmenter les dommages initiaux, parmi eux, le malondialdéhyde (MDA) est un aldéhyde réactif avec un caractère mutagène et athérogène qui se décompose spontanément en acétaldéhyde (AA). Ces deux aldéhydes sont capables d'induire des modifications protéiques et d'entrainer la production d'adduits protéiques MDA-AA appelés malondialdéhyde-acétaldéhyde ou MAA (Thiele *et al.*, 2015). La PR, contrairement à l'arthrose, est marquée par une augmentation d'adduits MAA au niveau des tissus synoviaux inflammés (Thiele *et al.*, 2015) et les patients PR vont présenter une augmentation des anticorps anti-MAA au niveau sérique et de manière encore plus marquée au niveau du liquide synoviale (Mikuls *et al.*, 2017). Ces anti-MAA sont présents à la fois chez les patients PR-ACPA⁺ et PR-ACPA⁻ et pourraient contribuer eux-aussi à la perte de tolérance initiant la PR ou participer à la progression de la pathologie. Pour l'instant, leur rôle dans la physiopathologie de la PR reste à définir.

III. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

1. Les mécanismes physiopathologiques selon les stades de la pathologie

La PR est une pathologie complexe et les mécanismes physiopathologiques mis en jeu sont multiples et varient en terme d'intensité et de localisation, en fonction du stade de la pathologie : préclinique, précoce ou établi. La **Figure 9** présente la progression de la physiopathologie de la PR d'une manière globale, en individualisant les différentes périodes pathologiques qui seront développées dans cette partie.

1.1. PR préclinique

Dans la majorité des cas, la PR se développe des années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques observables, rendant difficile à déterminer la durée de cette période. L'hypothèse actuelle concernant le développement de la pathologie résulte de l'influence à la fois de facteurs environnementaux et de modifications épigénétiques chez un individu prédisposé génétiquement (voir CHAPITRE 1 : II. 3). Les facteurs de risques décrits dans la partie précédente peuvent conduire à des modifications post-traductionnelles, qui, lorsqu'elles augmentent et au contact du système immun, entrainent une perte de tolérance chez l'individu et le déclenchement d'une réponse immune. Ces éléments correspondent à la transition entre une susceptibilité à une PR et une PR préclinique (**Figure 9**).

Si l'on s'intéresse plus précisément aux mécanismes mis en jeu, la présence d'autoanticorps (*i.e.* FR, ACPA, anti-CarP principalement), des années avant le développement de la PR, suggère un rôle de ces autoanticorps dans l'initiation de la pathologie (Aho *et al.*, 1985; del Puente *et al.*, 1988; Kurki *et al.*, 1992; Rantapää-Dahlqvist *et al.*, 2003; Nielen *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013). Outre les autoanticorps, il semble exister dans cette période préclinique une surexpression plasmatique de cytokines, de chimiokines (*e.g.* IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, éotaxine, IFN γ , IL-10, IL-15...) et de la protéine C réactive (Deane *et al.*, 2010; Kokkonen *et al.*, 2010). Ces observations laissent supposer qu'en plus d'une auto-immunité précoce, la PR est caractérisée initialement par une inflammation systémique à bas bruit (différente de la synovite caractéristique d'une PR établie). De plus, contrairement à ce que l'on pourrait penser, des études récentes ne suggèrent pas un déclenchement de la pathologie au niveau articulaire mais plutôt en dehors, au niveau des muqueuses buccale, pulmonaire et/ou intestinale (Catrina *et al.*, 2014; Demoruelle, Deane and Holers, 2014; Catrina, Deane and Scher, 2016; Mikuls *et al.*, 2016). L'une des hypothèses basée sur l'ensemble de ces observations explique qu'une exposition à un ou des facteurs de risque augmente les modifications post-traductionnelles des protéines/peptides (*e.g.* la citrullination) au



Figure 9 : De la susceptibilité à une polyarthrite rhumatoïde vers son établissement

à l'intérieur de la membrane synoviale et le développement d'une inflammation correspond au passage d'une synovite asymptomatique à symptomatique dans la phase de PR précoce. À un stade Chez une personne prédisposée génétiquement, l'association entre modifications épigénétiques et l'exposition à des facteurs environnementaux peuvent conduire à des changements mécanistiques au sein de l'organisme. Ces mécanismes peuvent correspondre par exemple, à des modifications post-traductionnelles, qui, à partir d'un certain seuil, conduiront à l'activation d'une réponse autoimmune. Cette transition entre susceptibilité à la PR et PR préclinique est marquée par une rupture de tolérance débutant au niveau des muqueuses (buccale, pulmonaire et/ou intestinale) puis, induisant une production d'auto-anticorps (ACPAs et/ou FR) dans la majorité des cas. S'en suit une réponse des systèmes immuns inné et acquis. L'infiltration progressive des cellules immunitaires plus avancé de la pathologie, la PR s'aggrave et conduit à une accélération de l'érosion osseuse et d'une destruction du cartilage entrainant des déformations articulaires importantes (adaptée de Malmström, Catrina & Klareskog, 2016 ; Smolen, Aletaha & McInnes, 2017 ; Smolen, Alehata & Barton, 2018) niveau des muqueuses, sites préférentiellement exposés aux facteurs de risques environnementaux. Ainsi, les protéines/peptides ayant subi des modifications post-traductionnelles forment des néoépitopes, aptes à interagir avec les protéines du complexe d'histocompatibilité (CMH). A partir d'un certain seuil, une réponse de l'immunité adaptative conduira à la production d'autoanticorps dont le FR ou les ACPA par les cellules B. Cette étape correspond à la perte de tolérance immune et constitue le « premier signal » (van Venrooij and Pruijn, 2014; Smolen *et al.*, 2018).

Concernant les mécanismes permettant d'expliquer le passage d'une auto-immunité extraarticulaire à articulaire et donc, d'une PR préclinique à précoce, plusieurs sont proposés mais restent mal connus. Dans la littérature on parle de « second signal » qui pourrait correspondre à une association entre des dommages tissulaires et vasculaires suite à un microtraumatisme, une dérégulation neuronale et/ou une infection articulaire.

Suite à ce second signal, les autoanticorps produits par la rupture de tolérance pourront se fixer à des antigènes et former des complexes immuns circulants (Zhao *et al.*, 2008). Ces derniers pourront *via* la micro-vascularisation synoviale se déposer au niveau de la membrane synoviale et du tissu synovial, et induire une vascularite ou, directement entrer dans la synoviale en modifiant la perméabilité membranaire et se fixer à des antigènes présents au sein de l'articulation (Arend and Firestein, 2012). La présence de cibles antigéniques similaires (*e.g.* vimentine citrullinée) au niveau du site d'initiation et de l'articulation est une autre explication plausible (Ytterberg *et al.*, 2015). S'ajoute une attractivité au niveau articulaire directement associée à l'effet pathogénique des ACPA (Harre *et al.*, 2012). En effet, les protéines citrullinées se trouvent en grande quantité dans les tissus synoviaux, formant des cibles privilégiées pour les ACPA et les complexes immuns circulants. Une fois au niveau articulaire, en synergie avec le FR, les ACPA vont induire une activité ostéoclastique (voir CHAPITRE 1 : III. 1.2.2 et **Figure 12**) (Smolen, Aletaha and McInnes, 2016; Malmström, Catrina and Klareskog, 2017; Tracy, Buckley and Raza, 2017; Weyand and Goronzy, 2017; Smolen *et al.*, 2018).

1.2. PR précoce vers un stade établi

La phase de recrutement cellulaire (cellules immunitaires et articulaires) associée à une inflammation au niveau articulaire marque le début d'une PR précoce (**Figure 9**). C'est à ce stade que les évènements s'accélèrent. Ainsi, l'activation du système immun va entrainer une infiltration de cellules immunitaires au niveau de la synoviale articulaire et le développement d'une synovite. La composition cellulaire de la synovite comprend d'une part, des cellules participant à l'immunité innée, avec les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et d'autre part, des cellules participant à l'immunité acquise, comme les cellules T (T_h1 et T_h17), les cellules B, les plasmablastes (*i.e.* cellules B activées aussi appelées plasmocytes) (Smolen, Aletaha and McInnes, 2016).

Ces acteurs cellulaires vont produire des cytokines et chimiokines qui vont entretenir et renforcer la réponse inflammatoire et participeront aux destructions articulaires (**Figure 12**). D'autres autoanticorps sont produits au sein de l'articulation durant la phase inflammatoire (*e.g.* autoanticorps dirigés contre le collagène de type 2, la glucose-6-phosphate isomérase, les protéoglycanes) contribuant à la pathogénicité de la PR (Smolen *et al.*, 2018).

L'évolution de la synovite est marquée par une altération visible de la membrane synoviale, qui, initialement constituée de 2-3 couches cellulaires, passe à plus d'une dizaine de couches cellulaires formant un pannus synovial composé de macrophages et de fibroblastes synoviaux (FLS) (Firestein and McInnes, 2017). Les fibroblastes résidentiels adoptent un phénotype presque malin avec une augmentation de l'expression des proto-oncogènes (*e.g. c-MYC, c-FOS*), une inhibition de l'apoptose, une sécrétion de cytokines, chimiokines, enzymes et vont voir leur métabolisme se modifier. Ces changements vont renforcer l'inflammation et participer à la destruction articulaire (Isaacs, 2010; Bustamante *et al.*, 2017). En outre, l'environnement inflammatoire s'enrichi progressivement jusqu'à former une boucle d'autorégulation positive permettant d'entretenir cet enrichissement.

Au stade établi, la PR est caractérisée par une perte cartilagineuse et osseuse entrainant des déformations articulaires (**Figure 9**). On sait qu'un taux élevé de FR et/ou d'ACPA (et nouvellement un taux élevé d'anti-CarP pour des PR-ACPA-) possède une valeur pronostic car est associé à des lésions articulaires (osseuses et cartilagineuses) plus sévères (Trouw, Huizinga and Toes, 2013; Harre, Kittan and Schett, 2014). La destruction du cartilage et de l'os articulaire met en jeu deux types de mécanismes. L'un, est directement dépendant de la progression de la pathologie et notamment du statut inflammatoire et de la progression du pannus synoviale. Alors que l'autre, moins drastique, fait intervenir des dispositifs plus spécifiques directement associés à des variations dans les remodelages osseux et cartilagineux (Smolen *et al.*, 2018). Ces mécanismes seront développés à la suite d'une part pour les lésions du cartilage puis d'autre part pour celles de l'os.

1.2.1 *Lésions cartilagineuses*

En condition physiologique, le cartilage possède un *turn-over* limité et son remodelage ne fait intervenir qu'un type cellulaire, les chondrocytes, qui réalisent à la fois la synthèse de la matrice cartilagineuse composée principalement de collagène de type 2 et de protéoglycanes mais aussi sa dégradation (Goldring, 2003). Dans le cas d'une PR, les principaux mécanismes mis en jeu sont décrits ci-dessous et présentés dans la **Figure 10** (McInnes and Schett, 2007).



Figure 10 : Dégradation du cartilage dans la polyarthrite rhumatoïde

Plusieurs mécanismes sont mis en jeu dans la dégradation du cartilage articulaire. Les chondrocytes impliqués dans la synthèse de la matrice composée de collagène et de protéoglycanes vont switcher vers un profil de dégradation de la matrice sous l'action de l'environnement cytokinique inflammatoire. S'ajoute une action directe des fibroblastes synoviaux qui envahissent la matrice et produisent des enzymes protéolytiques. Un autre mécanisme, indépendant de l'inflammation met en jeu un changement du profil phénotypique des chondrocytes qui vont rentrer en apoptose et former des lacunes dans la matrice cartilagineuse (adaptée de **McInnes & Schett, 2007**).

T_H: cellule T *helper*, **IL**: interleukine, **TNF**: facteur de nécrose tumorale, **ADAMTS**: disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, **MMPs**: métalloprotéinases

Le premier mécanisme est la conséquence directe du développement de la synovite (*i.e.* inflammation du *synovium*) et de l'ostéite (*i.e.* inflammation de la moelle osseuse juxta-articulaire). En effet, les acteurs de l'inflammation vont modifier l'environnement biochimique articulaire. Les cellules T et les fibroblastes synoviaux, par exemple, vont produire des cytokines comme les interleukines 1 (IL-1), 7 (IL-7), 17A (IL-17A), le *tumor necrosis factor* (TNF), capables d'activer chez les chondrocytes leur activité de dégradation (**Figure 10**). La matrice cartilagineuse sera par conséquent dégradée par différentes enzymes protéolytiques dont les principales sont les métalloprotéinases (MMPs) et les *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* (ADAMTs) produites par les chondrocytes mais aussi par les fibroblastes synoviaux ayant envahi le cartilage (Herz *et al.*, 2014).

De manière intéressante la destruction cartilagineuse peut se dérouler en l'absence de pannus et d'inflammation sévère (Rannou *et al.*, 2006). En effet, le second mécanisme met en jeu une modulation phénotypique des chondrocytes entrainant une augmentation de leur apoptose et la formation de lacunes (Pap and Korb-Pap, 2015). Concernant la séquence temporelle de dégradation du cartilage, il est supposé que la perte des protéoglycanes précèderait et faciliterait la dénaturation du collagène de type 2 et par conséquent, la destruction du cartilage, conduisant *in fine* à une raideur puis une déformation articulaire (Rannou *et al.*, 2006).

1.2.2 *Lésions osseuses*

a. Remodelage osseux en condition physiologique

Contrairement au cartilage, le squelette adulte est en renouvellement permanent grâce à un mécanisme que l'on appelle le remodelage osseux. Le remodelage osseux est défini depuis les années 70s comme « l'ensemble des processus continus de croissance, de renforcement et de résorption

osseuse qui interviennent dans la vie de l'os » (Cowin and Hegedus, 1976). Ce mécanisme permet le maintien de l'homéostasie osseuse et est dépendant des différents types cellulaires présents au sein de l'os.

Les premiers acteurs du remodelage osseux sont les ostéoblastes. Ils participent à la synthèse et à la minéralisation de la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, à son renouvellement chez l'adulte et à la réparation osseuse tout le long de la vie d'un individu. Les ostéoblastes qui ne meurent pas par apoptose se transforment en ostéocytes. Ce type cellulaire est majoritaire dans l'os et constitue des senseurs, notamment mécaniques, qui permettent d'orienter les ostéoblastes.

Avec un rôle opposé, les seconds acteurs sont les ostéoclastes (OC) et sont responsables de la résorption osseuse ou ostéoclasie. En condition physiologique, ce mécanisme est cyclique. Les OC sont issus du même lignage que les monocytes et les macrophages et possèdent une origine hématopoïétique. L'ostéoclastogenèse, présentée et expliquée dans la **Figure II**, est un mécanisme régulé par le complexe RANKL/RANK/OPG. Ce complexe est d'une part, activateur grâce au *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand* (RANKL) et son récepteur (RANK) et d'autre part inhibiteur *via* l'ostéoprotégérine (OPG). Une fois activés par RANKL/RANK, les OC vont migrer le long de la surface osseuse puis résorber activement la matrice osseuse en formant des lacunes de résorption ou lacunes de Howship. Durant ce remodelage, des enzymes lysosomales seront libérées comme la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) ou la cathepsine K (Cat K) qui peuvent être utilisées comme marqueurs de maturation et d'activation des OC.



Figure II: Ostéoclastogenèse

Le premier facteur à entrer en jeu est M-CSF. Il conduit à l'engagement des précurseurs de la moelle osseuse dans le lignage ostéoclastique formant des préostéoclastes. RANKL, produit par les ostéoblastes ou les cellules stromales, va se lier sur son récepteur RANK présent au niveau des préostéoclastes et va stimuler, leur fusion et leur activité de résorption. Les ostéoclastes matures sont de grandes cellules multinucléées d'environ 100 µm de diamètre qui libèrent, une fois activées, des enzymes lysosomales par exocytose comme la TRAP dont la concentration augmente avec l'accroissement du remodelage osseux ou la cathepsine K (d'après **Boyle et al., 2003**).

CFU-S : colony-forming unit-spleen, CFU-GM : colony-forming unit-granulocyte macrophage, M-CSF : macrophage colony stimulating factor, RANKL : receptor activating NFkB ligand, OPG : ostéoprotégérine, TRAP : phosphatase résistance au tartrate

b. Remodelage osseux dans la PR

La PR est marquée par une érosion osseuse avec un risque fracturaire chez les patients multiplié au moins par 1,5 (Deal, 2012). A la fois systémique et locale, cette perte osseuse est due à deux principaux mécanismes : l'auto-immunité et l'inflammation (**Figure 12**) (Kocijan, Harre and Schett, 2013).



Figure 12 : La perte osseuse associée à une polyarthrite rhumatoïde

La perte osseuse dans la PR relève à la fois d'un mécanisme auto-immun, qui débute précocement, dès le stade préclinique avec la présence d'autoanticorps (schéma de gauche). Mais aussi de l'inflammation articulaire où les acteurs de la synovite jouent un rôle important au stade de PR précoce puis établie (schéma de droite) (adaptée de **Catrina et al., 2016, Smolen et al., 2018**).

PAD : peptidyl-arginine désiminase, ACPA : auto-anticorps anti-protéines citrullinées, FcR : récepteur pour la partie constante des immunoglobulines, CCL : ligand de la chimiokine, TNF : facteur de nécrose tumorale, NGF : nerve growth factor, IL : interleukine, RANKL : ligand du récepteur activateur de NFkB, GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages, IFN : interféron, MMP : métalloprotéinases, TRAP : phosphatase acide résistance au tartrate.

Le premier mécanisme est mis en place dès le stade de PR préclinique (**Figure 12** – partie gauche). En effet, l'architecture osseuse corticale est précocement altérée chez les patients PR-ACPA⁺, en l'absence d'inflammation, laissant supposer un rôle direct des ACPA dans le remodelage osseux (Kleyer *et al.*, 2014). Des études *in vitro* ont démontré que les ACPA anti-vimentine, sont capables de lier et activer les ostéoclastes et d'induire une résorption osseuse une fois injectés chez la souris (Harre *et al.*, 2012; Catrina *et al.*, 2017). L'étude de Krishnamurthy a montré qu'en l'absence de synovite, l'activation ostéoclastique par les ACPA se fait *via* la libération d'IL-8 et bloquer cette interleukine prévient en partie la perte osseuse *in vitro* et *in vivo*. S'ajoute un rôle essentiel des enzymes clés de la citrullination : les PADs, dans ce processus et dans la différenciation des ostéoclastes. L'ajout d'un inhibiteur des PADs comme la chloramidine *in vitro* inhibe la différenciation des ostéoclastes (Krishnamurthy *et al.*, 2016).

Concernant la perte osseuse locale associée à l'inflammation, les techniques d'histologies ont pu montrer la présence, au niveau de l'interface entre os et pannus et au niveau de l'os sous-chondral, des marqueurs de la différenciation et de l'activation ostéoclastique comme la TRAP, la Cat K, le récepteur à la calcitonine ou RANKL (**Figure 12 – partie droite**) (Walsh and Gravallese, 2010). En effet, à un stade de PR précoce/établie, les acteurs de la synovite vont libérer des cytokines proinflammatoires ou des facteurs pro-ostéoclastogéniques dans le microenvironnement osseux capables de moduler le remodelage osseux. On peut notamment observer la libération de M-CSF par les cellules T ou RANKL par les cellules T et les FLS qui vont activer la différenciation des ostéoclastes (Smolen *et al.*, 2018). Les ostéoblastes contribuent, eux aussi, à la perte osseuse dans la PR. Ils modulent la différenciation et la fonction des ostéoclastes en produisant le principal facteur de différenciation RANKL (Walsh and Gravallese, 2010).

IV. Stratégies thérapeutiques dans le traitement de la PR

La prise en charge thérapeutique de la PR vise en premiers lieux à supprimer la synovite et l'inflammation systémique pour ralentir les destructions articulaires. On parle actuellement de la stratégie *Treat to Target* (T2T), utilisée dans le domaine de la rhumatologie dont le principe est « d'atteindre un objectif optimal prédéfini ». Dans la PR, cet objectif optimal est de tendre vers la rémission ou au moins une diminution de l'activité de la pathologie ce qui nécessite un suivi étroit des patients traités (Wendling, 2016; Bergstra and Allaart, 2018).

Le suivi des patients se fait en utilisant des outils objectifs et standardisés. Il existe différents scores d'activité mesurant différents paramètres : (1) les scores d'activité de la pathologie (DAS pour *Disease Activity Score*) avec le DAS44 (plus simplement appelé DAS) et plus récemment le DAS28, ce dernier étant l'outil le plus utilisé en pratique, (2) l'index simple d'activité de la pathologie (SDAI pour *Simplified Disease Activity Index*) plus simple que les scores DAS, (3) l'index clinique de l'activité de la pathologie (CDAI pour *Clinical Disease Activity Index*) qui ne prend pas en compte de paramètre biologique, ou encore, (4) l'index pour une évaluation routinière des patients (RAPID3 pour *Routine Assessment of Patient Index Data*) (Gaujoux-Viala, 2017). Outre les scores d'activité, les dernières recommandations de l'ACR et l'EULAR conseillent d'utiliser des analyses en imagerie (IRM ou US) pour suivre la progression de la pathologie et de prendre en considération les comorbidités associées (Colebatch *et al.*, 2013; Zufferey and Becce, 2014; Ferro *et al.*, 2017).

La prise de décision thérapeutique n'est pas linéaire, il existe des lignes directives et des recommandations quant aux thérapies à entreprendre présentées dans la sous-partie 2.4 de cette partie IV et dans la **Figure 16** (page 39). Mais ces décisions dépendent à la fois du clinicien en charge du patient ainsi que du patient lui-même et de sa propre PR. Classiquement, la prise en charge thérapeutique dans la PR comprend une association entre traitements symptomatiques et traitements de fond et s'accompagne généralement d'interventions thérapeutiques non médicamenteuses tels que de la kinésithérapie, de l'ergothérapie ou de l'éducation thérapeutique.

1. Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques (*i.e.* antalgiques, AINS et corticoïdes) ne sont que des traitements d'appoints. Ils permettent d'augmenter la qualité de vie du patient en diminuant les symptômes douloureux et inflammatoires mais ne participent pas à la rémission de la pathologie en tant que telle.

1.1. Antalgiques

Le premier motif de consultation en rhumatologie est la douleur ressentie chez les patients, qu'elle soit aiguë ou chronique. Sa prise en charge fait notamment intervenir des antalgiques. Nous distinguons plusieurs groupes d'antalgiques selon leur appartenance ou non à la famille des opioïdes, prescrits en fonction de l'intensité de la douleur ressentie par les patients (**Figure 13**).



Figure 13 : Les différents paliers des antalgiques

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, il existe une échelle d'emploi des antalgiques selon l'intensité de la douleur évaluée. Cette échelle comprend 3 paliers : (1) le premier regroupe les antalgiques dits périphériques, prescrits en cas de douleurs légères à modérées et comprend notamment les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, le paracétamol ou l'aspirine. (2) Le deuxième palier comprend les antalgiques centraux ou opioïdes faibles et sont prescrits pour des douleurs modérées à intenses. Les plus prescrits sont la codéine et le tramadol et ils peuvent être prescrits seul ou en association avec un antalgique de palier l (e.g. codéine-paracétamol). (3) Le troisième et dernier palier regroupe les antalgiques centraux ou opioïdes forts pour des douleurs très intenses ou rebelles. Ce palier peut se subdiviser en Illa pour les antalgiques prescrits par voie orale (e.g. sulfate de morphine, hydromorphone, oxycodone) et Illb pour ceux prescrits par voie parentérale ou centrale (e.g. chlorhydrate de morphine, fentanyl).

AINS : anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Dans la PR, des antalgiques de palier I comme des antalgiques-antipyrétiques : paracétamol ou acétaminophène, peuvent être prescrits. Le paracétamol est préconisé en première intention dans les douleurs peu intenses de l'appareil locomoteur à la posologie de 2 à 4 grammes par jour. Mais comme la PR est marquée par une inflammation, les antalgiques les plus utilisés sont les antiinflammatoires non-stéroïdiens (AINS) toujours de palier I. Ils forment un groupe chimique hétérogène et comprennent une trentaine de substances actives commercialisées en France (*e.g.* diclofénac, ibuprofène, méloxicam, naproxène...). Leur action est principalement périphérique et consiste à inhiber la synthèse des prostaglandines en bloquant l'activité des cyclooxygénases de type 1 et/ou 2 (*i.e.* COX-1 et COX-2 respectivement). Les inhibiteurs de COX-1 sont appelés AINS non sélectifs alors que les inhibiteurs de COX-2 correspondent aux coxibs et ces derniers possèdent une meilleure tolérance digestive. Dans la PR, ils sont utilisés pour réduire l'inflammation aiguë (lors d'une poussée inflammatoire), diminuer modérément les symptômes douloureux et les raideurs matinales. Ils constituent un traitement symptomatique quasi-systématique mais leur toxicité digestive (*e.g.* ulcères gastro-duodénaux) limite leur utilisation à long terme.

Les antalgiques de palier II sont parfois prescrits pour des formes sévères de PR mais ceux de palier III ne sont par contre pas recommandés. D'une manière générale la chronicité de la pathologie ne permet pas d'utiliser les antalgiques à long terme.

1.2. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GC) sont utilisés depuis 70 ans dans le traitement de la PR (Bijlsma and Jacobs, 2014). Ils ont un effet anti-inflammatoire et une action immunomodulatrice. L'effet antiinflammatoire résulte de multiples mécanismes. Par exemple, les GC sont capables d'inhiber la phospholipase A₂, la production de médiateurs inflammatoires (*e.g.* prostaglandines, leucotriènes...) ou de radicaux libres. En outre, cet effet peut être médié par un mécanisme de transrépression (*i.e.* action transcriptionnelle indirecte induite par l'interaction entre les GC et des facteurs de transcription bloquant l'expression des gènes cibles) qui inhibe la synthèse de protéines pro-inflammatoires, soit par un processus transcriptionnel direct conduisant à la synthèse de protéines anti-inflammatoires comme l'annexine-1 ou l'IL-10. En tant qu'immunomodulateur, l'action des GC passe par l'induction des composants de l'inflammasome (*i.e.* macro-complexe moléculaire impliqué dans l'immunité innée formé d'un récepteur, un adaptateur et la caspase 1 qui est l'effecteur du complexe) (Dejean and Richard, 2013).

Grâce à son efficacité rapide sur la symptomatologie de la PR, les GC sont prescrits dès le diagnostic d'une PR et sont très utiles lors d'une poussée inflammatoire mais ils doivent être utilisés sur une courte durée. Les recommandations actuelles prévoient une dose faible (\leq 7,5 mg/jour) ou moyenne (10 mg/jour) par voie orale principalement (ou parentérale dans certains cas) de prednisone ou prednisolone en association avec un traitement de fond (Berner and Gabay, 2014; Smolen *et al.*, 2014, 2017). En comparaison aux AINS, les GC à faible dose possèdent un bon bénéfice clinique à court et moyen terme et permettent de ralentir de manière significative la progression de la pathologie et particulièrement les érosions osseuses (Kirwan *et al.*, 2007). Le principal effet indésirable de la corticothérapie est une augmentation du risque d'infection notamment chez les personnes âgées (Bijlsma, Jacobs and Buttgereit, 2015).

2. Traitements de fond

Contrairement aux traitements symptomatiques qui agissent uniquement sur les symptômes de la PR, les traitements de fond ont un réel effet sur la cause et par conséquent, sur l'évolution de la pathologie. Les principales thérapies répondant à la stratégie du T2T dans le traitement de fond de la PR sont les *Disease Modifying AntiRheumatic Drugs* (DMARDs). Il en existe plusieurs types : (1) les « synthétiques conventionnels » ou csDMARDs, (2) les « synthétiques ciblés » ou tsDMARDs et (3) les « biologiques » ou bDMARDs.

2.1. DMARDs synthétiques conventionnels - csDMARDs

2.1.1 *Méthotrexate*

Le méthotrexate (MTX), conçu en 1940, constitue le traitement de première intention de la PR du fait de son profil favorable concernant à la fois son efficacité, sa sécurité, sa tolérance, et les effets indésirables qu'il induit. L'efficacité thérapeutique du MTX à de faibles doses a été montrée dès 1985 (Weinblatt *et al.*, 1985), mais les mécanismes sous-tendant cette efficacité restent encore imprécis. Il n'existerait pas un, mais plusieurs mécanismes d'action du MTX à faibles doses dans la PR qui sont présentés dans la **Figure 14** (Hazlewood *et al.*, 2016).



Figure 14 : Mécanismes d'action potentiels du méthotrexate à de faibles doses dans la PR

Plusieurs mécanismes d'action sont proposés pour le MTX lorsqu'il est utilisé à faibles doses dans la PR. Ils comprennent l'antagonisme des folates, la stimulation de la signalisation adénosine, l'inhibition de la production de donneurs de méthyle, la genèse d'espèces réactives de l'oxygène, la diminution des éicosanoïdes et des métalloprotéinases matricielles, la modification des cytokines ou encore la diminution de l'expression des molécules d'adhésion (d'après **Brown et al., 2016**).

Le méthotrexate étant le plus communément utilisé, il est intéressant de comprendre de manière plus spécifique comment il peut agir. Certains des mécanismes sont développés dans la **Figure 15** et sa légende, et permettent par exemple de mettre en avant la diminution des folates qui font souvent l'objet d'une thérapie de complémentation (Tian and Cronstein, 2007; Kaltsonoudis, Papagoras and Drosos, 2012; Brown, Pratt and Isaacs, 2016).



Figure 15 : Schéma simplifié des mécanismes d'action du méthotrexate

Le méthotrexate est un analogue de l'acide folique et entre dans la cellule par une voie de transport actif des folates. Son dérivé est polyglutamaté et va inhiber d'une part (1) la dihydrofolate réductase (DHFR) de manière non spécifique, qui empêchera la conversion du dihydrofolate en tétrahydrofolate et conduira à diminuer la conversion de l'homocystéine en méthionine. La méthionine est un substrat de la conversion de la SAM qui représente le principal donneur de méthyle dans la cellule. Le MTX_{Glu} est aussi capable (2) d'inhiber la thymidylate synthase entrainant une diminution de la synthèse de résidus thymidine *de novo*. Le MTX_{Glu} peut aussi inhiber (3) la 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) transformylase (aussi appelée ATIC), conduisant à une accumulation de l'AICAR. L'accumulation de ce métabolite intermédiaire de la voie de biosynthèse des nucléotides conduira à une action anti-inflammatoire *via* l'augmentation d'adénosine intracellulaire et extracellulaire. En effet, l'augmentation d'AICAR va inhiber l'enzyme de conversion de l'adénosine en inosine : l'adénosine déaminase (ADA) et l'enzyme de conversion de l'adénosine en inosine : l'adénosine déaminase (ADA) entrainant une accumulation d'adénosine intracellulaire de la cellule (adaptée de **Tian & Cronstein, 2007 ; Kaltsonoudis et al., 2012 ; Brown et al., 2016**).

En clinique, le MTX est généralement administré une fois par semaine à une dose comprise entre 7,5 et 25 mg chez les patients PR par voie orale ou sous-cutanée (Smolen *et al.*, 2017). Cette dernière étant la voie présentant la meilleure biodisponibilité. Il est prescrit avec une supplémentation en acide folique pour limiter ses effets indésirables (Kaltsonoudis, Papagoras and Drosos, 2012). Environ 40% des patients avec une PR précoce sont répondant au MTX en monothérapie (Hazlewood *et al.*, 2016). Il peut aussi être prescrit en combinaison avec d'autres DMARDs, ce qui s'avère plus efficace (Luong Ba and Gabay, 2014; Ferro *et al.*, 2017). Les effets indésirables associés à la prise du MTX dans la PR sont une hépatotoxicité, des troubles gastro-intestinaux, des troubles hématologiques (anémie, leucopénie, thrombocytopénie) et parfois une atteinte pulmonaire. Malgré une bonne efficacité du MTX, une proportion non négligeable de patients, variant de 20 à 40%, n'obtient pas une efficacité suffisante ou présente une intolérance au MTX (Gabay *et al.*, 2014). C'est pourquoi, il existe d'autres csDMARDs qui peuvent être introduits dans la stratégie thérapeutique, seul ou en combinaison.

2.1.2 Sulfasalazine

La sulfasalazine (salicylazosulfapyridine ou SSZ) est un DMARD synthétique conventionnel qui a été synthétisé en 1938 spécifiquement pour le traitement de la PR (Aggarwal and Abraham, 2016). La SSZ est convertie en acide 5-aminosalicylique (5-ASA) associé à du sulfapyridine (sulfamide) par les bactéries intestinales. Dans le foie, le sulfamide est métabolisé par acétylation, hydroxylation et glucoronidation. La SSZ est utilisée dans la PR pour inhiber l'expression de cytokines inflammatoires et la migration des cellules inflammatoires (Smedegård and Björk, 1995; Davila and Ranganathan, 2011). La posologie est de 2 à 3 g/jour (voir plus pour l'EULAR) par voie orale et selon l'HAS, la SSZ constitue une alternative de première intention en cas de contre-indication ou d'intolérance au MTX et peut être prescrite lors d'une trithérapie avec du MTX et de l'hydroxychloroquine.

2.1.3 Léflunomide

Le léflunomide ou LEF est un immunomodulateur introduit en 2001 dans le traitement de la PR. Il constitue une pro-drogue, qui une fois administrée par voie orale est convertie en un métabolite actif : le tériflunomide. Ce métabolite possède un effet antiprolifératif et inhibe sélectivement la synthèse *de novo* des pyrimidines. Cette inhibition stoppe la prolifération de cellules T qui sont des acteurs importants dans la physiopathologie de la PR (I Keen, Conaghan and Tett, 2013). En clinique, le léflunomide constitue un traitement alternatif en cas de contre-indication ou d'intolérance au MTX. Le traitement débute par une dose de charge de 100 mg par jour pendant trois jours puis une dose d'entretien à la posologie de 10 à 20 mg par jour (Hochberg *et al.*, 2007; Smolen, Aletaha and McInnes, 2016; Smolen *et al.*, 2017).

2.2. DMARDs biologiques - bDMARDs

Introduits dans la stratégie thérapeutique de traitement de la PR en 1998, les DMARDs biologiques ont une action au niveau des cytokines (TNF-α, IL-1, IL-6) ou d'acteurs cellulaires (cellules T et B).

2.2.1 Inhibiteurs des cytokines

a. Anti-TNF

Parmi les DMARDs biologiques, les mieux connus et les plus utilisés sont les inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale alpha (*tumor necrosis factor* ou TNF- α ou cachexine ou cachectine). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire exprimée initialement au niveau transmembranaire, qui, suite à un clivage protéolytique par une enzyme de conversion du TNF- α (*i.e.* TACE ou ADAM17), est libérée sous forme soluble. C'est un acteur pléiotropique, qui exerce son action *via* deux types de récepteurs : le type 1 (TNFR1) qui est ubiquitaire et le type 2 (TNFR2) dont l'expression est limitée aux neurones,

aux cellules immunitaires et aux cellules endothéliales (Kalliolias and Ivashkiv, 2016). Les souris surexprimant le TNF- α développent spontanément une PR, suggérant un rôle important de cette cytokine dans la physiopathologie de la PR (Keffer *et al.*, 1991). Chez les patients polyarthritiques, les taux de TNF- α sont augmentés dans le liquide synovial et le *synovium* (Di Giovine, Nuki and Duff, 1988; Saxne *et al.*, 1988). Au niveau de ce dernier, en modulant l'activité des macrophages, des synoviocytes, des chondrocytes et des ostéoclastes, le TNF- α induit une inflammation locale et participe à la formation du pannus synovial responsable de l'érosion du cartilage et de l'os (Radner and Aletaha, 2015). Il semble que son effet pathogénique dans la PR soit notamment lié à l'induction de l'expression de l'IL-1 (Palladino *et al.*, 2003).

Les premiers anti-TNF- α dans la PR ont été développés dans les années 1980s et depuis, il en existe cinq différents utilisés en clinique : (1) <u>l'infliximab</u>, administré par voie intraveineuse, c'est un anticorps monoclonal chimérique (souris/Homme), (2) <u>l'adalimumab</u>, administré par voie souscutanée, c'est un anticorps monoclonal humain capable de prévenir la liaison du TNF à son récepteur, (3) le <u>certolizumab pegol</u>, administré par voie sous-cutanée, est un anticorps monovalent humanisé comprenant le fragment Fab associé à une molécule de polyéthylène glycol (PEG) (4) <u>l'étanercept</u>, administré par voie sous-cutanée, est une protéine génétiquement modifiée formée d'un domaine extracellulaire du TNFR2 et de la portion Fc de l'IgG1 et (5) le <u>golimumab</u>, administré par voie sous-cutanée, est un anticorps monoclonal humain capable de lier à la fois la forme transmembranaire et la forme soluble du TNF.

La prise d'un anti-TNF en association avec le MTX a montré une efficacité clinique et participe à la prévention de la progression radiologique (Radner and Aletaha, 2015). Il n'y a actuellement aucune recommandation unitaire concernant l'anti-TNF à prescrire. Le choix revient au clinicien qui doit prendre en compte les comorbidités associées, la voie d'administration du traitement ainsi que le cadre de prescription.

b. Anti-Il-6

Outre les anti-TNF, l'arsenal des bDMARDs comprend des inhibiteurs de l'interleukine-6 (IL-6). Cette cytokine est pléiotropique et joue un rôle central dans l'intégration de la réponse immune contre des infections. La signalisation de l'IL-6 fait intervenir son récepteur spécifique et une glycoprotéine de surface, la gp130 comme transducteur du signal. Elle possède une action pro-inflammatoire et participe à l'activation des cellules T, la prolifération des cellules B et la différenciation des ostéoclastes. Dans la PR, les patients présentent une augmentation plasmatique d'IL-6 corrélée à la sévérité de la PR et aux dommages radiologiques articulaires. Cette surexpression est retrouvée au niveau du liquide synovial d'articulation arthritique. L'IL-6 est impliquée dans le

développement des symptômes systémiques (*e.g.* fatigue, douleur) et dans l'inflammation locale, la formation du pannus ou encore la résorption osseuse (Kim *et al.*, 2015).

Le chef de file des anti-IL-6 est le tocilizumab, introduit en 2010 dans le traitement de la PR. C'est un anticorps monoclonal humanisé capable de lier de manière spécifique les récepteurs solubles et membranaires de l'IL-6 (Calabrò *et al.*, 2016). Ce fut le premier agent biologique montrant une efficacité statistique supérieure au MTX en monothérapie (Gabay *et al.*, 2014). Il est prescrit principalement chez les patients non-répondeurs au MTX ou à d'autres scDMARDs à la dose de 4 mg/kg/mois administrée par voie intraveineuse ou à la dose de 162 mg par semaine par voie sous-cutanée. Les principaux effets indésirables du tocilizumab sont des infections, des troubles gastro-intestinaux, des désordres biochimiques et des maux de tête (Rossi *et al.*, 2015). En 2017, le sarilumab, un antagoniste du récepteur de l'IL-6, a été approuvé par la FDA chez les patients avec une PR modérée à sévère et non répondeur aux autres DMARDs (Lamb and Deeks, 2018).

c. Anti-IL-1

L'interleukine 1 ou IL-1 participe à la pathogénicité de la PR. Approuvé par la FDA en 2001, l'anakinra est une forme recombinante du récepteur soluble de l'IL-1. L'anakinra est administré par injection sous-cutanée à la dose de 100 mg/jour mais sa place reste limitée compte tenu de sa moindre efficacité par rapport aux autres biothérapies.

2.2.2 Inhibiteurs cellulaires

a. Inhibiteurs des cellules T

Les cellules T (T_{reg} et T_h17) constituent le type cellulaire le plus abondant du *synovium* dans une PR (de 30 à 50% des cellules). Les cellules T_h17 participent à la pathogénicité de la PR en activant les macrophages et en produisant de l'IL-17, un acteur de l'inflammation auto-immune. Les inhibiteurs des cellules T font partis d'un groupe de médicaments appelés modulateurs de co-stimulation sélectifs (immunomodulateurs) qui ont été introduits dans le traitement de la PR depuis le début des années 1990s avec comme chef de file : l'abatacept (Isaacs, 2008). C'est une protéine de fusion recombinante comprenant le domaine extracellulaire de CTLA-4 (*i.e.* antigène des lymphocytes T cytotoxiques 4 ou CD152) et un fragment de la portion Fc de l'IgG1. L'abatacept joue un rôle de modulateur de co-stimulation. Il cible le signal de co-stimulation CD28 nécessaire à une activation complète des cellules T et bloque ainsi leur activation (Olive *et al.*, 2011; Keating, 2013). Dans la PR, il est prescrit à la dose de 10 mg/kg par voie intraveineuse toutes les deux ou quatre semaines ou à la dose de 125 mg par semaine par voie sous-cutanée (Gabay *et al.*, 2014).

b. Inhibiteurs des cellules B

Les cellules B exercent leur rôle pathogénique dans la PR par plusieurs mécanismes : (1) la production d'autoanticorps (FR et ACPA), (2) la présentation des antigènes associés à l'activation des cellules T et la coopération entre cellules B et T, (3) la production de cytokines, (4) la régulation immune et (5) la modification de l'homéostasie osseuse (Bugatti *et al.*, 2014).

Approuvé en 2006 par la FDA, notamment pour les PR réfractaires, le rituximab est un anticorps monoclonal anti-CD20 qui cible les cellules B matures circulantes ou tissulaires. Le CD20 est une phosphoprotéine non glycosylée située sur les lymphocytes pré-B et B matures. Dans la PR, il est prescrit à la dose de 1 g par voie intraveineuse à D_0 et D_{14} (Scher, 2012). De manière intéressante, les patients séronégatifs pour le FR ou les ACPA ne répondent pas au rituximab.

2.3. DMARDs synthétiques ciblés - tsDMARDs

Comme 20 à 50% des patients ne présentent pas une réponse adéquate aux DMARDs conventionnels ou biologiques, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont vu le jour, avec notamment des DMARDs ciblés comme les inhibiteurs des Janus kinases (JAK) (Calabrò *et al.*, 2016). La famille des JAK est une famille de protéines tyrosine kinases associées à des récepteurs, comprenant JAK1, JAK2, JAK3 et la tyrosine kinase de type 2 (TYK2). Les JAK vont phosphoryler les STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) capable de moduler l'expression génique. Les voies JAK-STAT jouent un rôle important dans la signalisation des cytokines et participent au processus immunopathologique (Schwartz et al., 2017).

Les inhibiteurs des JAKs, appelés les jakinibs, ont été utilisés dans différentes pathologies (*e.g.* psoriasis, colite ulcérative) et notamment dans la PR où le premier développé : le tofacitinib inhibant JAK3, JAK1 et dans une moindre mesure JAK2, montre une bonne efficacité chez les patients non répondant au méthotrexate ou les patients naïfs, en monothérapie ou en combinaison avec le MTX mais n'est approuvé par la FDA que pour les patients réfractaires au MTX (van Vollenhoven *et al.*, 2012; E. B. Lee *et al.*, 2014; Fleischmann *et al.*, 2017; Schwartz *et al.*, 2017).

Les Jakinibs approuvés ou en étude clinique sont listés dans l'encadré ci-contre. On retrouve notamment le baricitinib qui est approuvé par l'agence médicale européenne (AME) et cible JAK1 et JAK2. Le baricitinib seul ou en association avec le MTX a montré une bonne efficacité pour des patients non répondeurs au MTX dans une étude de phase IIb (Keystone *et al.*, 2015) et une efficacité supérieure au MTX seul dans une étude de phase III (Fleischmann *et al.*, 2017).



L'avantage premier de ces thérapies est leur faible coût car la synthèse d'inhibiteur est plus simple que la synthèse d'anticorps comme pour les autres DMARDs (Kotyla, 2018).

Les principaux effets indésirables retrouvés suite au traitement par les Jakinibs sont : l'augmentation du risque d'infections opportunistes et sévères, une anémie, une leucopénie, une réactivité augmentée à la tuberculose et des troubles gastro-intestinaux (Schwartz *et al.*, 2017).

2.4. Stratégie de traitement à entreprendre dans le cas d'une PR

Comme nous venons de le voir, l'arsenal thérapeutique dans la PR est assez large et plusieurs stratégies peuvent être envisagées en fonction du diagnostic effectué par le spécialiste, des contreindications liées au patient et par la suite, de l'efficacité des thérapies entreprises. La **Figure 16** présente les recommandations faites par l'EULAR pour la stratégie du T2T de la PR.



Figure 16 : Recommandations de l'EULAR pour la stratégie du T2T de la polyarthrite rhumatoïde

Cette figure présente l'algorithme correspondant aux recommandations de l'EULAR de 2016 pour la PR suite à son diagnostic. Il existe 3 phases potentiellement envisageables (d'après **Smolen et al., 2017**).

FR : facteur rhumatoïde, **ACPA** : autoanticorps anti-protéines citrullinées, **bDMARDs** : DMARDs biologiques, **tsDMARDs** : DMARDs synthétiques ciblés, **csDMARDs** : DMARDs synthétiques conventionnels

2.5. Notion de fenêtre thérapeutique

Introduite dans les années 1990s, la « fenêtre d'opportunité thérapeutique » dans la PR correspond à une période précoce, comprise entre les premiers symptômes et les 3 à 6 premiers mois (*i.e.* phase de PR précoce) à l'intérieur de laquelle la pathologie est apparemment plus sensible aux traitements (van Nies et al., 2015; Zink and Albrecht, 2017). Ce concept est basé sur les observations suivantes : une prise en charge thérapeutique précoce de la PR est associée à (1) une augmentation de l'efficacité des traitements utilisés et (2) un retard dans la progression de la pathologie (Gerlag et al., 2016, van Steenbergen et al., 2017). Cette notion doit être prise en compte dans la stratégie du Treat to Target (T2T). En effet, plus la stratégie thérapeutique débute tôt dans la PR, plus les chances d'aboutir à une rémission ou une diminution de l'activité de la PR augmente. Mais comment expliquer cette différence de réponse aux traitements sur une période de seulement quelques mois ? Si l'on s'intéresse à cette fenêtre en termes mécanistiques, plusieurs hypothèses sont avancées par la communauté scientifique. Par exemple, il semble que la synovite observée dans cette fenêtre soit qualitativement et quantitativement différente de celle observée dans une PR établie avec un environnement cellulaire et cytokinique différent (Raza, 2010). De plus, la durée de cette fenêtre parait variable en fonction du type de PR : elle serait de 11,4 semaines pour une PR-ACPA⁺ comparativement à 15 semaines pour une PR-ACPA-, laissant supposer un lien entre la production d'ACPA et les changements physiopathologiques impliqués dans la susceptibilité au traitement (van Nies et al., 2015).

Le problème actuel pour la mise en place d'un traitement précoce au sein de la fenêtre d'opportunité thérapeutique repose sur la rapidité d'un diagnostic précoce de la pathologie. La première complication relève du délai de consultation. Par exemple, en Europe, le délai médian entre l'apparition des symptômes et la première consultation chez un rhumatologue pour un patient PR est d'environ 24 semaines avec une proportion significative de patients se trouvant d'ores et déjà en dehors de la fenêtre d'opportunité thérapeutique (Raza and Filer, 2015). La deuxième difficulté, elle, est basée sur les outils diagnostics actuellement disponibles qui ne sont pas toujours adaptés à un diagnostic précoce. Et enfin, la symptomatologie précoce ressemble à d'autres pathologies que la PR.

Enfin, nous savons que les premiers évènements associés au développement d'une PR peuvent débuter une dizaine d'années, voire plus, avant l'apparition des premiers symptômes cliniques observables, et ceci, au niveau des muqueuses (buccale, pulmonaire, intestinale). La notion de fenêtre d'opportunité thérapeutique pourrait donc être élargie en considérant la période de PR asymptomatique ou préclinique et le diagnostic pourrait prendre en compte des modifications biologiques différentes de celles actuellement utilisées comme outil diagnostic (*e.g.* nouveaux marqueurs biologiques au niveau des muqueuses buccale, pulmonaire et/ou intestinale, nouveaux anticorps pour les PR-ACPA-...).

V. Problématique actuelle : manque de prise en charge de la douleur dans la polyarthrite rhumatoïde

La PR impacte fortement la qualité de vie des patients, principalement à cause de la douleur chronique ressentie. Ce symptôme est le premier à motiver une consultation chez un spécialiste et constitue la priorité pour les patients polyarthritiques (Heiberg and Kvien, 2002). Or, dans la PR, la stratégie du T2T vise en premier lieu à diminuer l'activité de la pathologie (Bergstra and Allaart, 2018), quelle que soit la douleur ressentie par les patients, montrant ainsi une discordance dans la perception de la pathologie entre le patient et le rhumatologue (Taylor *et al.*, 2010). De plus, la douleur articulaire (arthralgie) se développe bien souvent avant même la présence de signe d'inflammation articulaire, et par conséquent avant même un diagnostic et la mise en place d'une stratégie thérapeutique de la PR. Ainsi, il existe une dichotomie entre le ressentie du patient et la prise en charge thérapeutique par les rhumatologues majoritairement focalisés sur une diminution de l'activité de la PR entrainant une prise en charge de la douleur insatisfaisante pour une grande partie des patients.

Malheureusement, la prise en charge de la douleur est rendue difficile car l'arsenal thérapeutique est limité dans la douleur arthritique. En effet, il existe de nombreuses molécules avec un potentiel antalgique ou analgésique (*e.g.* paracétamol, opioïdes, antidépresseur tricyclique, capsaïcine...) mais ce sont des traitements utilisables à court terme avec un ratio bénéfice/risque faible après plus de 6 mois de traitement (Walsh and McWilliams, 2014). Il apparait donc difficile de traiter directement la douleur. A l'heure d'aujourd'hui, la douleur est traitée indirectement en diminuant notamment l'inflammation. Mais ceci sous-tend que le patient se trouve déjà dans une PR précoce ou établie et non plus dans la fenêtre d'opportunité thérapeutique. L'étude de Taylor avait pu mettre en évidence plus de 60% d'insatisfaction dans la prise en charge de la douleur chez des patients avec une douleur principalement modérée voir sévère (**Figure 17**) (Taylor *et al.*, 2010).



Figure 17 : Pourcentage de patients présentant une douleur légère, modérée ou sévère et la satisfaction quant à sa prise en charge

(A) Que ce soit en Europe ou aux USA, entre 75 à 80% des patients polyarthritiques présentent une douleur modérée à sévère et (B) plus de 60% sont insatisfaits concernant la prise en charge de celle-ci (d'après **Taylor et al., 2010**).

En outre, une proportion non négligeable de patient avec une faible activité de la pathologie ou en rémission présente une douleur persistante (Lee *et al.*, 2011; Y. C. Lee *et al.*, 2014).

Compte tenu de ce que nous avons pu voir, il semble indispensable de reconsidérer la prise en charge de la douleur dans la PR, qu'elle soit légère, modérée ou sévère, d'une part pour améliorer la qualité de vie des patients et d'autres part car une réduction significative de la douleur participe à améliorer l'efficacité des traitements de fond. L'utilisation de molécule analgésique à long terme en combinaison avec des traitements de fond est une perspective future pour la prise en charge de la PR. Mais, aucune molécule à l'heure actuelle possédant un bon ratio bénéfice/risque n'est présente sur le marché. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes douloureux associés à une PR afin de proposer de nouvelles cibles antalgiques voire analgésiques. Le prochain chapitre s'intéressera à la douleur et particulièrement à la douleur articulaire dans un contexte de PR.

CHAPITRE 2 :

La douleur articulaire dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde

I. Douleur et nociception : généralités

1. Définition de la douleur aiguë versus chronique

La définition de la douleur la plus souvent citée est celle proposée par l'I.A.S.P (*International Association for the Study of Pain*) définissant la douleur comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en terme évoquant une telle lésion ». C'est une expérience toujours subjective qui est ainsi modulée par les expériences passées, l'affect, des influences cognitives, le genre et même certaines attentes culturelles.

Il existe trois grands types de douleur : aiguë, chronique et procédurale (*i.e.* induite par les soins) (**Figure 18**). La douleur aiguë se distingue de la douleur chronique notamment par sa composante temporelle. En effet, la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD) définit la douleur aiguë comme « un signal d'alarme lié à une atteinte tissulaire brutale (*e.g.* traumatisme, lésion inflammatoire, distension d'un viscère...), souvent associée à des manifestations neurovégétatives (*e.g.* tachycardie, sueurs...) et de l'anxiété ». Alors que la douleur chronique est définie par la Haute Autorité de Santé (HAS) par une « persistance ou une récurrence de la douleur au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale présumée, notamment si la douleur évolue depuis plus de trois mois », par une « réponse insuffisante au traitement » et par une « détérioration significative et progressive des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière ».



Figure 18 : Les différents types de douleur

On peut différencier 3 grands types de douleur : aiguë, chronique et procédurale. La douleur chronique comprend elle-même 3 sous-types : par excès de nociception, neuropathique et nociplastique (d'après **l'I.A.S.P et la SFETD**).

La douleur chronique constitue une pathologie en soi avec un caractère multidimensionnel. En fonction des mécanismes étiologiques, il existe trois types de douleur chronique : (1) la douleur par excès de nociception (majoritairement inflammatoire) due à « la stimulation persistante et excessive des récepteurs périphériques de la douleur : les nocicepteurs », (2) la douleur neuropathique liée à « une lésion ou une pathologie affectant le système somatosensoriel » et (3) la douleur nociplastique marquée par « un dysfonctionnement des systèmes de contrôle de la douleur sans lésion identifiée » (*e.g.* fibromyalgie, céphalée de tension...) (**Figure 18**).

2. Nociception à l'origine de la perception douloureuse

La douleur débute généralement par l'activation de récepteurs sensoriels spécialisés des structures somatiques ou viscérales appelés nocicepteurs, qui véhiculent l'information nociceptive vers le système nerveux centrale. La première phase de la genèse de la douleur ou nociception consiste au processus neuronale d'encodage des stimuli nociceptifs et ne doit pas être confondue avec la perception douloureuse (**Figure 19**) (Risch, Pointeau and Poquet, 2017).



Figure 19 : Distribution anatomique de la nociception et de la perception douloureuse

La nociception correspond au processus par lequel un stimuli périphérique (ici, au niveau articulaire) est transmis par une fibre afférente primaire : le nocicepteur, à la moelle épinière puis au tronc cérébral puis au thalamus et aux structures souscorticales. La douleur, quant à elle, est une expérience résultant de l'activation du réseau thalamo-cortical et donc du processus de transmission et d'intégration de la nociception (adaptée de **Grace et al., 2014**).

CI : cortex insulaire, **SI** : cortex somatosensoriel, **ACC** : cortex cingulaire antérieur, **PFC** : cortex pré-frontal, **CeA** : amygdale, **PAG** : substance grise périaqueducale, **LC** : locus coeruleus, **RVM** : région rostro-ventrale-médiane du bulbe rachidien

En effet, la nociception est une modalité somatosensorielle qui se réfère au transfert d'un signal nerveux généré par l'activation de récepteurs spécifiques suite à l'exposition à des stimuli potentiellement dangereux, nocifs et est mesurable par des paramètres objectifs. Et ce n'est qu'après traitement de cette information par les systèmes nerveux périphérique (SNP) et central (SNC) que l'information devient une perception douloureuse. La douleur en tant que telle doit être intégrée par les centres cérébraux supérieurs et résulte d'une expérience subjective. Ceci sous-tend que la nociception peut être présente en absence de douleur et une douleur présente en l'absence de signal nociceptif (Tracey, 2017).

La nociception comprend cinq composantes : (1) la **transduction** : transformation d'un stimulus en message nerveux, (2) la **conduction** : acheminement du message nerveux des fibres périphériques vers les voies centrales, (3) la **transmission** : passage du message nerveux d'une synapse à une autre, (4) la **perception** : phénomène cérébral à l'origine de la perception douloureuse et (5) la **modulation** : mécanisme de régulation des messages nociceptifs et de leur perception (Risch, Pointeau and Poquet, 2017).

II. Mécanismes à l'origine de la douleur – Transmission du message nociceptif et sa modulation

1. Transduction au niveau périphérique par les nocicepteurs

1.1. Généralités sur les nocicepteurs

La notion de nocicepteur est apparue dans les années 1900 grâce au neurophysiologiste et pathologiste britannique, Sherrington, qui postula de l'existence de récepteurs spécifiques à des stimuli potentiellement dangereux ou capables de créer des dommages tissulaires (Sherrington, 1906). A l'heure actuelle, nous définissons les nocicepteurs comme les terminaisons libres de certains types de fibres nerveuses afférentes primaires de seuil d'activation élevée, capables de détecter et d'encoder des stimuli potentiellement nocifs pour l'organisme, de nature thermique (*i.e.* au chaud \geq 40-45°C ou au froid \leq 15°C), mécanique (*i.e.* pression intense) ou chimique (*i.e.* avec un effet supposé ou réel de dommage tissulaire).

1.1.1 Fibres afférentes primaires - classification

Chez l'Homme, on distingue trois grands groupes de fibres afférentes primaires, classées en fonction de leur anatomie (*e.g.* présence d'une gaine de myéline ou non, leur diamètre) à laquelle s'associe une vitesse de conduction nerveuse (VCN) et de leur fonctionnalité : (**1**) les fibres myélinisées A α et A β , (**2**) les fibres faiblement myélinisées A δ et (**3**) les fibres non myélinisées C (**Tableau 8**). Parmi elles, les fibres nociceptives correspondent aux fibres A δ et aux fibres C, responsables respectivement, de la douleur primaire (*i.e.* douleur rapide, aiguë et vive) et de la douleur secondaire (*i.e.* douleur retardée, plus diffuse et atténuée) (**Tableau 8** – graphiques) (Julius and Basbaum, 2001).


Tableau 8 : Classification des fibres afférentes primaires

Il existe différents types de fibres afférentes primaires avec des caractéristiques spécifiques, présentées dans ce tableau. Comme on peut le voir sur les graphiques de gauche, deux types de douleur peuvent être considérés : (1) la douleur primaire, résultant de l'activation des fibres A δ répondant au caractère rapide et aiguë de la douleur et (2) la douleur secondaire, résultant de l'activation des fibres C (adapté de **Julius & Basbaum, 2001, Djouhri & Lawson, 2004**).

Ces fibres nociceptives ou nocicepteurs possèdent une morphologie pseudo-unipolaire (*i.e.* un prolongement unique à partir du corps cellulaire qui se sépare en deux branches axonales : l'une est périphérique ciblant les organes et l'autre est centrale innervant la moelle épinière). Elles vont former, au niveau périphérique, une arborisation présente au niveau des tissus cutanés, musculaires, articulaires et dans les parois des viscères. Leurs corps cellulaires sont situés au niveau des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRGs) et pour ceux de la face au niveau du ganglion trigéminal (Basbaum *et al.*, 2009).

1.1.2 Fibres afférentes primaires innervant l'articulation

Contrairement à l'innervation somatique superficielle qui a été largement décrite, peu de données existent concernant l'innervation somatique profonde du squelette et en particulier de l'articulation. On sait que l'innervation au niveau du squelette adulte (*i.e.* os et articulations) est très différente de celle de la peau, ce qui est illustré dans la **Figure 20**.



Moelle épinière

Figure 20 : Innervation de l'os et de la peau

La majorité des fibres afférentes primaires innervant l'os sont des fibres A δ (ou du groupe III) à 75% alors que les fibres C (ou du groupe IV) ne représentent que 25% de l'innervation articulaire. Ces fibres expriment dans 80% des cas TrkA et sont donc sensibles au ligand de TrkA : le facteur de croissance des nerfs ou NGF. Avec un profil différent, l'innervation de la peau comprend majoritairement des fibres C à 70%, des fibres A δ à hauteur d'environ 20% et des fibres A β (ou du groupe II) à 10%. Seuls 30% de ces fibres sont TrkA+ (d'après **Mantyh, 2014**).

TrkA : récepteur tyrosine kinase A

De plus l'innervation articulaire est variable en fonction des différentes structures : (1) la capsule, les ligaments, le périoste, l'os sous-chondral et les ménisques (1/3 externe seulement) sont innervés par des fibres A α , A β , A δ et C, (2) la membrane synoviale est exclusivement innervée par des fibres C et (3) le cartilage articulaire est normalement non innervé ainsi que les 2/3 internes des ménisques (Schaible and Grubb, 1993; Coutaux *et al.*, 2005; Nagy, Lukacs and Urban, 2006; Patrick W Mantyh, 2014; Sarzi-Puttini *et al.*, 2014).

De manière intéressante, on peut noter que 80% des fibres innervant l'os sont des fibres nociceptives (Aδ et C) exprimant le récepteur au *Nerve Growth Factor*, TrkA et sont donc sensibles au NGF alors que seul 30% des fibres innervant la peau sont TrkA⁺ (**Figure 20**) (Patrick W Mantyh, 2014). Ceci met en avant le rôle potentiellement crucial du NGF dans la douleur osseuse et dans la douleur articulaire ; notion qui fera l'objet d'une partie de ce manuscrit (voir CHAPITRE 3 : II.).

Au niveau articulaire, la nociception est étudiée principalement en utilisant des stimuli mécanique et chimique, la stimulation thermique des tissus profonds n'étant pas physiologique. La mise en mouvement de l'articulation conduit à l'application de pressions légères à modérées au niveau de l'articulation qui ne sont pas considérées comme nociceptives. Une pression intense ou une rotation excessive de l'articulation peuvent représenter des stimuli nociceptifs. Selon leur réponse au mouvement douloureux, les fibres afférentes primaires au niveau articulaire peuvent se subdiviser en différents groupes. Comme le montre la **Figure 21**, chez le chat, la proportion de fibres répondant aux mouvements douloureux ou non varie en fonction des groupes de fibres (Schaible and Grubb, 1993; Schaible, 2013). On constate qu'environ 1/3 tiers des fibres Aδ et C ne répondent pas au mouvement.



Figure 21 : Proportions de fibres A β , A δ et C répondant aux mouvements douloureux ou indolores

Etude réalisée chez le chat montrant la proportion des différents types de fibres répondant aux mouvements douloureux ou non au niveau de l'articulation du genou (d'après **Schaible & Grubb, 1993**).

Au niveau des différents compartiments osseux (périoste, os minéralisé et moelle osseuse) la majorité des fibres présentent sont des fibres NF200⁺ (*i.e.* fibres positives pour le neurofilament de 200 kDa qui constitue un marqueur des fibres myélinisées) et correspondraient aux fibres Aδ et des fibres CGRP⁺ (*i.e.* fibres positives pour le peptide associé au gène de la calcitonine qui constitue un marqueur des fibres poptidergiques) et correspondraient aux fibres Aδ et C riches en peptides (G. Castañeda-Corral *et al.*, 2011).

Outre les fibres nerveuses afférentes primaires nociceptives, l'articulation est aussi innervée par des fibres nerveuses sympathiques (cholinergiques et adrénergiques). Des études ont montré un rôle de ces fibres dans la régulation du métabolisme osseux, dans la vasodilatation/vasoconstriction des vaisseaux sanguins, dans l'infiltration des macrophages ou encore dans le fonctionnement des cellules progénitrices osseuses (Patrick W Mantyh, 2014).

1.2. Activation des différents types de nocicepteurs

La première étape dans le processus nociceptif est la transduction, c'est-à-dire le mécanisme par lequel un stimulus nociceptif est transformé en message nerveux (*i.e.* potentiels d'actions). L'activation des nocicepteurs dépend du seuil à partir duquel un stimulus est détectable par des récepteurs ou transducteurs présents au niveau des fibres afférentes primaires nociceptives, capables d'être activés par différents types de stimuli : thermique, mécanique et/ou chimique. Ainsi, on pourra différencier des nocicepteurs polymodaux activés par différents types de stimuli et des nocicepteurs activés plus spécifiquement par un stimulus particulier. Les fibres Aδ participent aux perceptions mécaniques, thermiques et chimiques qu'elles soient nocives ou non. Comme les fibres Aδ, les fibres C jouent un rôle dans les perceptions mécaniques, thermiques et chimiques, mais principalement nocives. On peut noter ici que la majorité des nocicepteurs sont des fibres C ou fibres A mécanosensibles et donc activés exclusivement par des stimuli mécaniques.

1.2.1 Activation des nocicepteurs par des stimuli thermiques

En condition physiologique, le seuil de perception de la douleur au froid se situe autour de 15°C, les températures qui lui sont inférieures sont donc considérées comme nociceptives. Pour le chaud, on considère douloureux une température supérieure à 40°C - 45°C (Dubin and Patapoutian, 2010). Les transducteurs thermiques nociceptifs les plus représentés sont les canaux *Transient Receptor Potential* (TRP) qui forment une grande famille de canaux ioniques perméables aux cations et activés différemment en fonction de la température (**Figure 22**) (Julius, 2013).

Pour les nocicepteurs au chaud, le chef de file est le canal TRP vanilloïde 1 (TRPV1) activé à une température \geq 43°C (Caterina *et al.*, 1997), mais il existe aussi les canaux TRPV2, TRPV3 et TRPV4 et

le canal TRP mélastatine 3 (TRPM3). D'autres canaux sont candidats comme thermo-transducteurs au chaud tels que les canaux potassiques K2P, les canaux *TWIK-related K*⁺ *channel*, TREK-1, TREK-2 et TRAAK ou le canal chloride TMEM16A/anoctamine (ANO1) (Tracey, 2017).



Figure 22 : Seuil d'activation des canaux TRP en fonction de la température

Les canaux TRP sont des canaux perméables aux cations. Ils jouent un rôle dans la thermo-nociception car ils sont activés par différentes températures considérées comme nociceptives. Pour le chaud, on a notamment TRPVI, V2, V3, V4 et TRPM3 et pour le froid, TRPM8 et TRPAI. L'intervalle de température compris entre les deux barres en pointillées constitue l'intervalle physiologiquement non nociceptif et les températures qui lui sont inférieures ou supérieures sont considérées comme nociceptives (adaptée de **Patapoutian et al., 2003**).

Pour le froid, le premier thermorécepteur à avoir été identifié, est le canal sensible au menthol TRPM8, qui est activé dans un intervalle de températures froides assez large non nociceptives et nociceptives (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002). S'ajoute le canal TRP ankyline 1 (TRPA1) qui est activé à des températures inférieures à 17°C, mais son rôle dans la perception nociceptive au froid reste controversé (Caspani and Heppenstall, 2009). L'ensemble des transducteurs thermiques sont regroupés dans le **Tableau 9** (page 52).

1.2.2 Activation des nocicepteurs par des stimuli mécaniques

a. Les différents types de mécanorécepteurs

Les senseurs mécaniques sont appelés des mécanorécepteurs et sont exprimés au niveau de la peau, des tendons, des muscles, des articulations et des viscères (Delmas, Hao and Rodat-Despoix, 2011). On peut différencier (1) les propriocepteurs qui permettront de détecter des stimuli mécaniques produits à l'intérieur de l'organisme, en particulier par le système musculo-squelettique (*e.g.* organes tendineux de Golgi, fuseau neuromusculaire) et (2) les mécanorécepteurs cutanés qui détecteront des stimuli mécaniques externes (*e.g.* corpuscule de Pacini, mécano-nocicepteur). Les mécanorécepteurs cutanés se répartissent en deux groupes : soit à bas seuil d'activation ou *low-threshold mechanoreceptors* (LTMs) qui répondront à des stimuli mécaniques non douloureux, soit à haut seuil d'activation ou *high-threshold mechanoreceptors* (HTMs) activés par des stimuli mécaniques douloureux (Delmas, Hao

and Rodat-Despoix, 2011). Les LTMs correspondent principalement aux terminaisons des fibres A β alors que les HTMs sont représentés par les fibres A δ et C. Les différents types de mécanorécepteurs présents au niveau de la peau sont présentés dans la **Figure 23** et détaillés dans la légende et permettent de mettre en avant la multiplicité des stimuli détectables.



Figure 23 : Les différents types de mécanorécepteurs cutanés

Il existe différents types de neurones sensoriels mécanosensibles. Parmi les LTMs à adaptation rapide, on retrouve les follicules pileux, les corpuscules de Meissner et les corpuscules de Pacini. Parmi les LTMs à adaptation lente, on retrouve les complexe neurite-cellules de Merkel, les corpuscules Ruffini et certaines fibres C. Enfin, les HTMs à adaptation lente sont représentés par les terminaisons des fibres nerveuses $A\delta$ et C (d'après **Delmas et al., 2011**).

LTMs ou LT : low-threshold mechanoreceptors, HTMs ou HT : high-threshold mechanoreceptors, RA : à adaptation rapide, SA : à adaptation lente

Au niveau articulaire, on retrouve comme mécanorécepteurs : les corpuscules de Ruffini qui sont des LTMs à adaptation lente (SA), les corpuscules de Pacini qui sont des LTMs cette fois à adaptation rapide (RA) et des terminaisons libres des fibres afférentes primaires qui sont des HTMs et qui nous intéresserons plus particulièrement.

b. Les mécanorécepteurs à haut seuil d'activation

La détection des stimuli mécaniques nociceptifs dépend de la présence de mécanotransducteurs spécifiques au niveau des HTMs qui ne sont, à l'heure actuelle, pas encore tous connus. Plusieurs candidats sont présentés dans le **Tableau 9**.

Parmi les mécanotransducteurs, on peut citer la superfamille des canaux sodiques épithéliaux – dégénérine ou ENac/DEG, et plus particulièrement les canaux ASICs ou *Acid-Sensing lon Channel*. L'invalidation génétique des canaux ASIC1, ASIC2 et ASIC3 chez la souris, a permis de mettre en avant leur rôle dans la mécanotransduction. Le rôle plus particulièrement d'ASIC3 dans la mécanotransduction sera développé dans une prochaine partie (CHAPITRE 2 : II. 1.3).

On peut ajouter aux canaux ASICs, les canaux potassiques à deux domaines pores : K2P, les canaux TWIK-related K+ channel, TREK-1 et TRAAK ont été identifiés comme des mécano-nocicepteurs. En effet, les souris invalidées pour le canal TREK-1 (TREK-1-/-) ou le canal TRAAK (TRAAK-/-) présentent une hypersensibilité mécanique (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). Identifiés dans une étude de criblage, les canaux non-sélectifs perméables aux Ca²⁺ Piezo1 et Piezo2 sont des mécanorécepteurs (Coste et al., 2010). Leur rôle dans la mécano-nociception semble plutôt relever d'un mécanisme de potentialisation. En effet, l'augmentation d'AMPc en condition inflammatoire pourrait via EPAC1 stimuler et potentialiser l'activité de Piezo 2 (Borbiro and Rohacs, 2017). Outre leur rôle dans la sensibilité thermique, les canaux TRP et plus particulièrement TRPA1 et TRPV4 semblent impliqués dans la mécano-nociception (Moore et al., 2018). Par exemple, l'utilisation d'un antagoniste de TRPA1 (e.g. HC-030031) supprime l'hyperalgie mécanique développée dans un modèle inflammatoire au CFA (Petrus et al., 2007). Les canaux calciques voltages-dépendants peuvent aussi jouer un rôle dans la mécanonociception (Tracey, 2017). Les canaux Cav3.2 semblent aussi être impliqués dans la mécanonociception, en effet, l'utilisation d'un inhibiteur de ces canaux (e.g. Mibefradil) entraine une diminution de l'hypersensibilité mécanique dans un modèle de neuropathie diabétique (Obradovic et al., 2014). Malheureusement, cette liste est loin d'être exhaustive, de nombreux autres candidats ont été proposés et le(s) mecanotransducteur(s) impliqué(s) dans la douleur mécanique suite à une lésion ne sont encore pas clairement identifié(s).

1.2.3 Activation des nocicepteurs par des stimuli chimiques

Nombre de conditions pathologiques sont associées à la libération de molécules chimiques capables de modifier l'excitabilité neuronale et donc de promouvoir un mécanisme nociceptif (Julius and Basbaum, 2001). En condition d'acidose (associée par exemple à une inflammation), les protons H⁺ libérés vont activer des canaux ou récepteurs sensibles aux protons que sont les canaux TRPV1, la famille des canaux ASICs, en particulier ASIC3 et les récepteurs RCPG : *ovarian cancer GPR1* (OGR1), GPR3, G2A et *T-cell death-associated gene 8* (TDAG8) (Sun and Chen, 2016).

Outre son rôle potentiel dans la perception des stimuli froids nocifs, le canal TRPA1 est un chémorécepteur aux irritants (*e.g.* l'acroléine, la formaline : polluants toxiques de l'air) ou aux certains médiateurs inflammatoires (*e.g.* 2-pentenal, bradykinine, ATP) (Julius, 2013; Tracey, 2017). Les senseurs de l'ATP sont les canaux ioniques purinocepteurs (*i.e.* P1 et P2). Dans les mécanismes nociceptifs, les

canaux P2X ou *ATP-gated ion channel* ont montré un intérêt particulier. Avec par exemple un rôle de P2X3, P2X4 et P2X7 dans la méchano-nociception, entre autre (Kuan and Shyu, 2016).

Transducer	Evidence	Sensitization
Mechanical		
ASIC1	Visceral afferents (↑ sensitivity in KO).	No published data regarding sensitization.
ASIC2	Visceral afferents (\uparrow , \downarrow , \leftrightarrow sensitivity in KO, afferent type-specific).	No published data.
ASIC3	Visceral afferents (\downarrow sensitivity in KO). Cutaneous afferents ($\uparrow,\downarrow,\leftrightarrow$ sensitivity in KO).	Required for sensitization of colonic, muscle, joint nociceptors.
Ca _v 3.2	Role in mechanosensitivity of down (fine) hair.	Target of acute modulation. Knock-down \downarrow injury-induced hypersensitivity.
TRPV1	Role in response to hollow organ distension (\downarrow sensitivity in KO).	Block central channels ↓ mechanical hyperalgesia.
TRPV4	Direct activation by osmotic challenge, \uparrow sensitivity with activation, \downarrow sensitivity with block, knock down or KO.	Visceral, cutaneous hypersensitivity in inflammation and nerve injury.
TRPA1	Cutaneous afferents $(\uparrow,\downarrow,\leftrightarrow)$ sensitivity in KO, \downarrow sensitivity with block). Visceral afferents (\downarrow sensitivity of subpopulations).	\uparrow with inflammation, \downarrow mechanical hypersensitivity with block and KO in somatic and visceral afferents.
TRAAK	Direct activation by mechanical stimuli.	No published data.
TREK1/2	Direct activation by mechanical stimuli, ↑ sensitivity in KO.	↑ inflammatory hyperalgesia, potential role in neuropathic pain.
P2X3	Indirect activation through ATP release from epithelial cells, \downarrow response to hollow organ distension in knock-down and KO.	Pro-nociceptive role in visceral and somatic pain associated with inflammation and nerve injury.
Thermal		
TRAAK/TREK-1	Directly activated by heating, closed by cooling; \uparrow response to cold in KO.	No published data.
NaV1.8	Resistant to cold-induced inactivation. Indirectly essential for cold transduction.	No published data.
TRPA1	Direct activation by cold stimulus, \downarrow cold sensitivity in some but not all KO studies.	Role in cold sensitivity following sensitization.
TRPM8	Direct activation by cold stimulus, \downarrow cold sensitivity in KO.	Role in increased cold sensitivity after injury (KO studies).
TRPV3	Direct activation by warm stimulus (presence in afferent is controversial).	'Selective activation' with farnesyl pyrophosphate increases nociceptive behavior.
TRPV4	Direct activation by warm stimulus.	More prominent role in mechanotransduction.
TRPV1	Direct activation by heat stimulus.	Multiple lines of evidence that TRPV1 is essential for thermal hyperalgesia associated with most types of tissue injury.
TRPV2	Direct activation by heat stimulus, but role in nociceptive processing remains controversial.	No published data
Chemical (ionotrop	bic only ^a)	
ASIC1-4	Direct activation by protons.	Role in ischemia-induced pain, muscle hypersensitivity.
TRAAK/TREK	Channel activity influenced by a number of endogenous mediators such as protons and acachidonic acid.	No published data.
TRPV1	Direct activation, modulation by protons, fatty acids, arachidonic acid derivatives, vanilloids.	Most compelling evidence for a role in thermal hypersensitivity.
TRPA1	Direct activation by a number of compounds (mustard oil, cinimaldehyde, acrolein, formalin).	Essential for chemical-induced hypersensitivity.
TRPM8	Direct activation by menthol.	Most compelling evidence for role in cold hypersensitivity.
P2X1-6	Direct activation by ATP (prominent role for P2X2/3).	Evidence for role in pain and hypersensitivity associated with injury to many different tissue types.
5-HT3	Direct activation by serotonin, role in subset of nociceptive afferents.	Most prominent role in visceral pain.
ACh (multiple subunits are pres- ent in DRG)	Direct activation by acetylcholine (ACh).	Increased subunit expression with injury, increased peripheral ACh with injury, may have pronociceptive role in periphery, antinociceptive role in central terminals.
Glutamate (GluR1-5, NR1-2)	Direct activation by glutamate and subtype-specific agonists.	Evidence for peripheral role in pain, but most compelling evidence for role on central terminals.
GABA (multiple subunits are pres- ent in DRG)	Direct activation by GABA and subunit-specific agonists.	May be inhibitory or excitatory depending on chloride equilibrium potential at receptor.

^aBecause of the large number of metabotropic receptors present in sensory neurons, they have not been included in the table. Bold entries have the most compelling evidence suggesting that selective block of the channel may have therapeutic efficacy in pain.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différents transducteurs potentiels thermiques, mécaniques et chimiquesExtrait de Gold & Gebhart, 2010.

1.3. Rôle du canal ASIC3 au niveau articulaire

Les canaux ioniques *Acid-Sensing Ion Channel 3* ou ASIC3, à l'origine appelés les canaux DRASIC pour *Dorsal Root ASIC*, sont des canaux cationiques excitateurs appartenant à la superfamille des canaux sodiques épithéliaux – dégénérine ou ENac/DEG sensibles à l'amiloride (Waldmann *et al.*, 1997). La structure globale du canal ASIC3 est présentée dans la **Figure 24 – A** et présente un canal en forme de calice. Ce canal est très sensible aux H⁺ car il est activé par de très faibles diminutions de pH extracellulaire (0,2 unité) par rapport au pH physiologique de 7,4 (Deval and Lingueglia, 2015). Les canaux ASIC3 ont la particularité de présenter deux types de profil d'activation en fonction des stimuli et de l'environnement physiologique : (1) ils vont soit générer uniquement un courant transitoire entrant qui dépolarise la membrane et qui peut conduire à la genèse de potentiels d'action, comme les autres canaux ASICs, ou (2) ils vont générer un courant biphasique, comme présenté dans la **Figure 24 - B**, comprenant un courant transitoire entrant puis un courant soutenu qui persiste tant que le pH reste acide. Ce dernier provoque une dépolarisation persistante sans genèse de potentiels d'action mais qui sensibilise les neurones à d'autres stimuli (Deval and Lingueglia, 2015).

Comme nous l'avons mentionné précédemment (CHAPITRE 2 : II. 1.2), les canaux ASIC3 jouent un rôle à la fois dans la mécanotransduction et dans la sensibilité chimique (Cheng, Jiang and Chen, 2018). Ainsi, le rôle des canaux ASIC3 a été mis en évidence dans différents contextes douloureux tels que dans la douleur musculaire (Sluka *et al.*, 2007), la douleur post-opératoire (E. Deval *et al.*, 2011), la douleur inflammatoire (Deval *et al.*, 2008), la douleur chimio-induite (Hori *et al.*, 2010) ainsi que dans la douleur articulaire (Ikeuchi *et al.*, 2008; Ikeuchi, Kolker and Sluka, 2009; Izumi *et al.*, 2012; Kathleen A Sluka *et al.*, 2013; Sugimura *et al.*, 2015; Hsieh *et al.*, 2017).

Au niveau articulaire, les canaux ASIC3 sont exprimés au niveau des fibres afférentes primaires, du cartilage articulaire de la plaque de croissance, des ménisques, des synoviocytes fibroblastiques (FLS) et enfin des ostéoclastes et ostéoblastes leur donnant un rôle physiologique potentiel important au niveau de l'articulation (Jahr *et al.*, 2005; Abdelhamid and Sluka, 2015). Par contre, leur expression au niveau des fibres afférentes primaires reste controversée en condition basale (Ikeuchi *et al.*, 2008; Ikeuchi, Kolker and Sluka, 2009). En effet, dans une première étude de 2008, l'équipe d'Ikeuchi n'avait pu observer qu'une expression des canaux ASIC3 au niveau du genou en condition inflammatoire (Ikeuchi *et al.*, 2008), alors qu'en 2009, ce même groupe montrait que 31% des fibres afférentes innervant le genou étaient positives pour ASIC3 en condition basale et qu'en condition inflammatoire, l'expression d'ASIC3 était augmentée d'environ 50% dans les fibres afférentes de petits diamètres, particulièrement les fibres peptidergiques CGRP+ (Ikeuchi, Kolker and Sluka, 2009).



Figure 24 : Le canal ASIC3

(A) Cette représentation schématique montre la structure des canaux ASICs dont fait partie le canal ASIC3. Le domaine extracellulaire forme comme une main en forme de poing renfermant une balle β . Le poignet est formé par deux domaines transmembranaires TMI et TM2 comme tous les canaux ASICs. (B) Les canaux ASIC3 sont très sensibles aux H⁺ et sont activés par de très faibles diminution de pH extracellulaire (0,2 unité) par rapport au pH physiologique de 7,4. Ces canaux peuvent présenter deux types de profil d'activation en fonction des cellules : (I) soit ils vont générer uniquement un courant transitoire entrant qui dépolarise la membrane et peut conduire à la genèse de potentiels d'action, comme les autres canaux ASICs (*profil non représenté*), (2) soit ils vont générer un courant biphasique comme présenté ici comprenant un courant transitoire entrant puis un courant soutenu qui persiste tant que le pH reste acide. Ce dernier provoque une dépolarisation persistante sans genèse de potentiels d'action mais qui sensibilise les neurones à d'autres stimuli. (C)(D) Réponses comportementales mécaniques (C) et inflammatoires (D) suite à l'induction d'une arthrite par l'injection d'un cocktail d'autoanticorps (modèle CAIA) chez les souris Asic3^{-/-} comparées à des souris Asic3^{+/+} (d'après Abdelhamid & Sluka, 2015, Sluka 2013, Cheng et al., 2018).

Malgré cette controverse en condition basale, des études chez les animaux knockout ASIC3 ont pu démontrer leur rôle dans la douleur articulaire. En effet, les souris invalidées pour le gène Asic3 (Asic3-/-) ne développent pas d'hyperalgie mécanique principalement secondaire (voir CHAPITRE 2 : III. 2 pour les notions d'hyperalgie primaire et secondaire) dans un modèle de douleur inflammatoire articulaire par injection de carragénine au niveau du genou (Ikeuchi et al., 2008), d'un modèle de PR induite par l'injection systémique de collagène (CAIA) (Figure 24C) (Kathleen A. Sluka et al., 2013) et d'un modèle d'arthrite induite par l'injection répétée d'adjuvant complet de Freund (CFA) au niveau de la cheville (Hsieh et al., 2017), contrairement aux souris Asic3+/+. De plus, l'utilisation de bloqueurs plus ou moins spécifiques a pu confirmer un rôle des canaux ASIC3 dans la mécanotransduction et la mécanonociception. En effet, l'application d'amiloride, un bloqueur non spécifique des canaux ASICs, au niveau de fibres afférentes répondant à la rotation mécanique du genou, inhibe leur activité (Heppelmann and McDougall, 2005). La toxine APETx2, isolée à partir de l'anémone de mer Anthopleura elegantissima, inhibe plus spécifiquement les canaux recombinants homo- ou hétéro-dimériques ASIC3 (Diochot et al., 2004). Elle inhibe le courant transitoire et environ 50% du courant soutenu à pH 7,0 de ces canaux. Cette toxine, administrée localement dans un modèle inflammatoire induit par le CFA, diminue l'hypersensibilité mécanique (Karczewski et al., 2010) et empêche le développement d'une hypersensibilité lorsqu'elle est administrée de manière préventive (Sugimura et al., 2015). Par contre, cette toxine semble pouvoir aussi inhiber l'activité d'autres canaux ioniques comme Nav1.2, Nav1.8 et hERG lorsqu'elle est utilisée à plus fortes doses (Blanchard, Rash and Kellenberger, 2012; Peigneur et al., 2012; Jensen et al., 2014).

Malgré une augmentation de l'expression des canaux ASIC3 en condition inflammatoire, leur rôle direct dans l'inflammation reste controversé avec d'une part des études qui montrent un effet protecteur et d'autres, un effet délétère. Une revue récente a présenté ce double rôle des ASIC3 (Yu *et al.*, 2018). Comme le montre la **Figure 24D**, dans le modèle CAIA, les souris *Asic3-/-* présentent une augmentation de l'inflammation synoviale, des destructions articulaires (cartilage et os) et des taux de cytokines plus élevées comparées aux souris *Asic3+/+*. L'expression des canaux ASIC3 au niveau des cellules de l'immunité innée (*e.g.* macrophages, cellules dendritiques, FLS) pourrait expliquer son effet protecteur (Abdelhamid and Sluka, 2015). Néanmoins, une étude plus récente a démontré que les souris *Asic3-/-* présentent une symptomatologie moins sévère, à différents stades d'une arthrite inflammatoire, avec une réduction du gonflement des pattes et des articulations, une diminution de l'inflammation synoviale et des lésions cartilagineuses et osseuses ainsi qu'une diminution de l'hyperalgésie mécanique (Hsieh *et al.*, 2017). De nouvelles études sont nécessaires pour clarifier le rôle direct de ces canaux dans les phénomènes inflammatoires au niveau articulaire.

Le premier élément en faveur d'un rôle des canaux ASIC3 dans la douleur, particulièrement inflammatoire, est donc leur rôle de senseurs chimiques, particulièrement de l'acidose. En effet, l'inflammation est marquée par une diminution du pH suite à la libération de protons par les acteurs de la synovite et les valeurs de pH obtenues correspondent aux valeurs physiologiques de pH d'activation des canaux ASIC3 ($pH_{1/2}$: 6,2 – 6,7) (Lingueglia, 2007). Mais de manière très intéressante, il a récemment été montré que les canaux ASIC3 sont activés en absence de variation de pH par des lipides : le lysophosphatidyl-choline (LPC) (Marra *et al.*, 2016) et l'acide arachidonique (AA) (Deval *et al.*, 2008) qui ont été identifiés, au moins pour le LPC, dans le liquide synoviale de patients souffrant de douleur articulaires inflammatoires ou non.

2. La conduction du message nerveux nociceptif et sa modulation au niveau central

Suite à la perception et la transduction du stimulus nociceptif au niveau de la périphérie par sur le neurone de premier ordre, le message nerveux est conduit vers la moelle épinière par le neurone de second ordre puis vers les centres supérieurs par le neurone de troisième ordre. A chaque étage relais, le message nociceptif peut être modulé par différents mécanismes (Risch, Pointeau and Poquet, 2017).

2.1. La corne dorsale de la moelle épinière – modulation spinale

La morphologie pseudo-unipolaire des fibres afférentes primaires nociceptives permet, suite à une dépolarisation neuronale, la conduction des potentiels d'action (PA) par les neurones de premier ordre de la périphérie vers la corne dorsale de la moelle épinière en passant par les DRGs où se trouvent les corps cellulaires de ces neurones (Basbaum *et al.*, 2009). Dans les différentes couches de la substance grise de la moelle épinière, les neurones de premier ordre vont faire synapses avec les neurones de second ordre (**Figure 25**).



Figure 25 : Organisation laminaire de la moelle épinière

La substance grise de la moelle épinière est constituée de dix couches ou *laminae* appelées les couches de Rexed (Rexed, 1952). Schématiquement, la corne dorsale est formée par les *laminae* l à V comportant principalement des neurones sensitifs, les couches VI et VII sont dites intermédiaires et la couches X est centrale et entoure le canal de l'épendyme. La corne ventrale, quant à elle, est formée par les *laminae* VIII et IX et constitue une zone d'efférences motrices. Les couches VI et VII sont dites intermédiaires. Les nocicepteurs d'origines articulaires vont se projeter essentiellement au niveau des *laminae* l à VII (d'après **Craig et al., 1988, Schaible and Grubb, 1993, Todd, 2010**). Des études électrophysiologiques au niveau des couches de la moelle épinière ont permis de différencier trois grands types de neurones recevant les informations des afférences des fibres sensorielles primaires dont deux types sont nociceptifs : (1) les neurones nociceptifs spécifiques, (2) les neurones nociceptifs non spécifiques ou neurones polymodaux ou neurones *wide dynamic range* (WDR) et (3) les neurones non nociceptifs spécifiques (Calvino, 2006).

La corne dorsale de la moelle épinière est le premier lieu de modulation du signal nociceptif. Cette modulation spinale repose sur la fameuse théorie du portillon ou *gate control* présentée dans la **Figure 26** (*i.e.* mécanisme inhibiteur par lequel les afférences myélinisées A α et A β inhibent celle des fibres A δ ou C *via* un neurone de transmission) (Melzack and Wall, 1965). Cette théorie est à l'origine d'alternatives thérapeutiques non médicamenteuses comme la neurostimulation électrique transcutanée (TENS) qui peut être proposée pour soulager les douleurs rhumatismales comme dans la PR.



Figure 26 : La théorie du portillon ou gatecontrol

Cette théorie constitue un mécanisme de modulation spinale du signal nociceptif et repose sur le fait qu'un signal non-nociceptif transmis par les fibres A α ou A β peut bloquer un signal nociceptif transmis par les fibres A δ et C. L'activation des fibres A α ou A β inhibe la réponse des neurones de transmission en activant des interneurones inhibiteurs présents dans la substance gélatineuse de la moelle épinière. En parallèle, les fibres A δ et C peuvent elles-aussi activer des interneurones cette fois-ci activateurs des neurones T (adaptée de **Perl, 2007**).

+ : excitation, - : inhibition

SG : substance gélatineuse, **T** : neurone de transmission

Un autre système de contrôles endogènes peut se mettre en place suite à une stimulation douloureuse intense. Ce sont les « contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive » (CIDN) découvert en 1979 (Le Bars, Dickenson and Besson, 1979a, 1979b). Ces CIDN sont capables d'inhiber les neurones *wide dynamic range* dans la moelle épinière et le système trigéminal grâce à une boucle spino-bulbo-spinale. De manière singulière, ce système n'est activé que par une stimulation nociceptive et ne répond pas à une organisation somatotopique. Toutes les structures activées et les neurotransmetteurs impliqués dans ce système ne sont pas totalement déterminés, pour autant, on sait que le noyau réticulaire dorsal pourrait participer aux CIDN et la mise en jeu du système sérotoninergique est plus que probable (Sprenger *et al.*, 2015).

2.2. Le tronc cérébral et les centres supérieurs – modulation supra-spinale et corticale

Suite à sa modulation au niveau spinal, le message nerveux est conduit jusqu'au tronc cérébral, principalement par les voies spinothalamique et spinoparabrachiale, où deux structures sont principalement impliquées dans la modulation supra-spinale du message nociceptif : la substance grise périaqueducale (PAG) dans le mésencéphale et la région rostro-ventrale-médiane du bulbe rachidien (RVM) qui associe le noyau du raphé magnus (NRM) dans le myélencéphale et les noyaux paragigantocellulaire et gigantocellulaire (**Figure 27**). La stimulation de ces structures va mettre en jeu des voies descendantes inhibitrices capables d'inhiber les neurones nociceptifs non spécifiques (WDR) via une boucle de rétroaction négative. Il est important de noter qu'il existe aussi des voies descendantes facilitatrices capables d'amplifier le message douloureux et qui pourraient participer au maintien de la douleur.

Au niveau des centres supérieurs, l'intégration du message nociceptif fait intervenir une neuromatrice de la douleur ou *pain matrix* qui traite les informations des afférences nociceptives pour en donner une synthèse sensorielle appelée « neurosignature » décrite par Melzack suite à l'observation du phénomène de douleur du membre fantôme (Melzack, 1990, 2005). Ce concept, considéré comme trop restrictif, a depuis évolué, et fait maintenant intervenir la notion d'expérience et d'une connectivité cérébrale à la fois statique et dynamique. On parle donc maintenant plutôt de connectome dynamique de la douleur ou *dynamic pain connectome*, terme employé par l'équipe de Davis en 2015 qui le définit comme « la signature spatio-temporelle du réseau de communication cérébrale qui représente l'intégration de tous les aspects de la douleur » (Kucyi and Davis, 2015; Davis *et al.*, 2017).





Ces deux schémas présentent les voies ascendantes (gauche) et descendantes (droite) principales de la moelle épinière vers le cerveau et inversement activées par un stimulus nociceptif et qui participent à sa modulation (d'après **Davis et al., 2017**).

PAG: substance grise périaqueducale, **PB**: noyau parabrachiale, **HT**: hypothalamus, **PFC**: cortex préfrontal, **BG**: ganglion basal, **ACC**: cortex cingulaire antérieur, **PCC**: cortex cingulaire postérieur, **SI/S2**: cortex somatosensoriel I ou 2, **MI**: cortex moteur primaire, **SMA**: cortex moteur supplémentaire, **PPC**: cortex pariétal postérieur, **RVM**: région rostro-ventrale-médiane du bulbe rachidien

Comme le montre la **Figure 27**, nombre de zones cérébrales sont activées suite à une stimulation nociceptive. Lorsque la douleur se chronicise, comme dans une PR, il en résulte des anomalies au niveau des connections fonctionnelles entres ces différentes zones (Flodin *et al.*, 2016). Par exemple, on peut retrouver une mauvaise hiérarchisation des informations par le réseau de saillance (*i.e.* réseau implanté dans le cortex cingulaire antérieur et le cortex insulaire possédant des connexions vers les structures limbiques et sous corticales participant à la sélection et à la hiérarchisation des informations perçues par l'organisme), une augmentation des interconnexions entre le réseau du mode par défaut (DMN), le réseau dorsal de l'attention (DAN) et le réseau de contrôle des tâches fronto-pariétal (Schrepf *et al.*, 2018). Dans la même étude, ces auteurs ont montré qu'il existe une corrélation entre l'altération des connectivités cérébrales et l'inflammation chez les patients PR (Schrepf *et al.*, 2018). Les changements au niveau du SNC peuvent aussi dépendre des comorbidités associées à la PR, comme l'anxiété, la dépression ou la prise médicamenteuse. Un statut douloureux chronique peut aussi entrainer le développement de douleurs dites mémoires dues à l'altération du cortex somatosensoriel S1 qui participent au maintien de l'hypersensibilité même en l'absence de stimulus (Henry, Chiodo and Yang, 2011).

III. La douleur dans la polyarthrite rhumatoïde : d'une arthralgie vers une douleur articulaire inflammatoire chronique

Comme présentée dans la **Figure 28**, la douleur dans la PR est un élément complexe de cette pathologie que l'on peut subdiviser en fonction de ses stades. Souvent associée à un mécanisme inflammatoire, la douleur articulaire n'est en réalité que peu corrélée au statut inflammatoire de la PR (Sarzi-Puttini *et al.*, 2014). En effet, le contrôle de la douleur dans la PR peut être très insuffisant malgré un contrôle plutôt optimal de l'inflammation (Lee *et al.*, 2011). L'un des premiers symptômes chez les patients est la présence d'une arthralgie précoce dans la phase d'arthrite préclinique, lorsque la PR n'est pas encore diagnostiquée et que les phénomènes inflammatoires sont encore peu présents. Une fois diagnostiquée, la PR est marquée par une douleur modérée à sévère dans 75 à 80% des cas, notamment liée à l'environnement inflammatoire articulaire (Taylor *et al.*, 2010). Suite à une prise en charge thérapeutique, les nouvelles stratégies du T2T permettent de diminuer fortement l'activité de la pathologie (phase de rémission) mais la douleur ressentie perdure souvent dans le temps. Cette partie de ma thèse présentera les différents mécanismes pouvant participer aux symptômes douloureux associés à chacune des différentes phases de la PR.



Figure 28 : Les différentes étapes de la douleur ressentie en fonction de l'activité de la pathologie

Dans la PR, on peut distinguer plusieurs phases concernant la douleur ressentie par les patients : (1) une arthralgie est possible avant même le développement de la pathologie et serait associée à la production précoce d'autoanticorps, (2) la douleur va augmenter avec le développement de la synovite et donc de l'activité de la pathologie, (3) suite à une bonne prise en charge de la pathologie, la douleur va diminuer avec le score clinique de la pathologie en phase de rémission et (4) certaines personnes présentent des douleurs persistantes malgré une entrée en phase de rémission avec une diminution de l'activité de la pathologie (d'après un Webinar de Camilla Svensson au *Pain Research Forum* d'Avril 2016, McWilliams & Walsh, 2017a, Steebergen et al., 2017).

1. L'arthralgie

La douleur articulaire sans signe clinique observable ou modification apparente de l'articulation, comme un(e) inflammation/œdème/gonflement/raideur, est appelée arthralgie. Elle peut se développer très précocement constituant un facteur de risque pour le développement d'une PR et peut aussi persister chez des patients en phase de rémission c'est-à-dire présentant une diminution de l'activité de la pathologie suite à un traitement par des DMARDs (**Figure 28 – n°1 et 4**) (Lee *et al.*, 2011; Lee, 2013; Altawil *et al.*, 2016; McWilliams and Walsh, 2017a).

1.1. Rôle des ACPA dans l'arthralgie

Comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre, les ACPA jouent un rôle important dans la physiopathologie de la PR et sont produits bien avant la présence des premiers signes cliniques d'une PR (voir CHAPITRE 1 : II. 4.3.2). Deux-tiers des patients PR sont positifs pour les ACPA (entre 55 à 91% en fonction de la méthode de détection et du seuil sélectionné) alors qu'ils sont présents dans moins de 2% de la population générale, leur conférant un rôle spécifique dans la PR (van Zanten *et al.*, 2017). La présence d'une arthralgie précoce associée à la production d'ACPA constitue un risque de développer une PR (Bos *et al.*, 2010; van de Stadt *et al.*, 2013). On peut parler de pathologie associée aux ACPA pour cette phase précoce déjà marquée par la présence de symptômes douloureux (**Figure 29**).



Figure 29 : La douleur dans les différentes phases de la PR

Dès la production d'ACPA, la PR est marquée par une douleur chronique qui se retrouve durant la phase active de la PR ainsi que lorsque la pathologie est contrôlée médicalement (d'après une collaboration avec **Camilla Svensson**).

PR : polyarthrite rhumatoïde, ACPA : anticorps anti-protéines citrullinées, ↗ : augmentation, ↘ : diminution

Si l'on s'intéresse d'un peu plus près au rôle des ACPA dans le développement de l'arthralgie, jusqu'en 2016, aucun lien direct entre la présence d'autoanticorps, dont les ACPA, et l'arthralgie n'avait encore été établi. Ainsi, l'étude de Wigerblad *et al.*, a montré pour la première fois que l'injection d'ACPA polyclonaux humains ou de certains clones monoclonaux murinisés isolés du synovium de patients PR, induisait un comportement douloureux chez la souris (douleurs spontanée et évoquée) en absence d'inflammation apparente (**Figure 30**) (Wigerblad *et al.*, 2016).



Figure 30 : Sensibilité mécanique (évoquée) suite à l'injection d'ACPA monoclonaux chez la souris

(A) Mesure par ELISA de la spécificité des différents clones d'anticorps monoclonaux dérivés de cellules B de patients PR humains aux peptides : CEP-I, cit-fib, cit-vim et CCP, (B) score visuel d'inflammation articulaire pour chaque clone d'ACPA, (C)(D) mesure de la sensibilité mécanique durant 20 jours après l'injection intraveineuse des clones ACPA C7 et D10 (C) ou du clone ACPA B2 ou de l'anticorps contrôle E2 (D) par rapport à des souris saline (extrait de l'article **Wigerblad et al., 2016**).

CEP-I : peptide α -énolase citrulliné I, **cit-fib** : fibrinogène citrulliné, **cit-vim** : vimentine citrullinée, **CCP**, peptide cyclique citrulliné, **sal** : saline, **mAb** : anticorps monoclonaux, **ACPA** : anticorps anti-peptides citrullinés

Les ACPA forment une famille très hétérogène et peuvent être différenciés en sous-types. Comme le montre la **Figure 30** avec l'utilisation de différents clones, leur potentiel nociceptif est variable et pourrait dépendre d'épitopes citrullinés spécifiques bien que chez l'Homme aucune corrélation évidente n'a pu être mis en évidence entre le profil de fixation des protéines citrullinées par les ACPA et la sévérité de la pathologie (Wigerblad *et al.*, 2016).

La partie constante des immunoglobulines appelée fragment Fc détermine la fonction effectrice des anticorps et est influencée par la séquence en acides aminés qui la constitue ainsi que des groupements qui lui sont associés. Plusieurs études se sont intéressées au profil des fragments Fc des ACPA et, de manière intéressante, elles ont montré une diminution de la galactosylation et de la sialylation des fragments Fc des ACPA-IgG1 comparés aux IgG1 totales, au niveau sérique et au niveau du liquide synovial chez des patients avec une PR précoce (Scherer *et al.*, 2010; Rombouts *et al.*, 2015) et dans un modèle murin d'arthrite induite au collagène (CIA) (Pfeifle *et al.*, 2017). A ceci, s'ajoute une augmentation de la fucosylation des Fc. Ces changements phénotypiques précoces des fragments Fc des ACPA pourraient traduire l'acquisition d'un profil pro-inflammatoire et certainement pro-nociceptif en faveur de l'hypothèse d'un lien direct entre ACPA et progression de la pathologie (Molendijk, Hazes and Lubberts, 2018).

Quelques soient les hypothèses mécanistiques faisant actuellement le lien entre les ACPA et la douleur, et en particulier l'arthralgie, l'érosion osseuse semble un facteur crucial. En 2012, les premières preuves *in vitro* montrant que les ACPA sont capables de lier et d'activer spécifiquement les ostéoclastes ont été publiées (Harre *et al.*, 2012). Dans cette même étude, les souris injectées avec des ACPA isolés de patients atteints de PR présentent une activation ostéoclastique et une perte osseuse. Ces résultats soulèvent un certain nombre de questions sur les mécanismes sous tendant cette activation des ostéoclastes induite par des anticorps, et font actuellement l'objet d'une recherche active : (1) La liaison des ACPA (et les effets fonctionnels ultérieurs) est-elle unique aux ostéoclastes ? (2) La spécificité fine et/ou d'autres caractéristiques des ACPA sont-elles importantes ? et (3) Quelles sont les voies de signalisation activées suite à la liaison des ACPA à leurs cibles sur les ostéoclastes ?

Ainsi, les ACPA sont capables de se lier au niveau des précurseurs ostéoclastiques CD68⁺ et des ostéoclastes présents au niveau de la moelle osseuse, de l'os sous-chondral et de la plaque de croissance au niveau de l'articulation (mais pas au niveau du synovium), et cette liaison semble unique aux ACPA en comparaison à d'autres types d'autoanticorps (Harre *et al.*, 2012; Krishnamurthy *et al.*, 2016). Cette liaison semble médier l'effet pro-nociceptif des ACPA (Wigerblad, manuscrit de thèse 2016). En effet, l'activation des ostéoclastes et de l'ostéoclastogenèse par les ACPA entrainerait la libération de CXCL1 (*CXC-chemokine ligand 1*), l'analogue murin de l'interleukine 8 (IL-8) humaine. L'injection de CXCL1 dans l'articulation de la cheville chez la souris est capable d'induire une douleur. A contrario, le blocage de ses récepteurs spécifiques (CXCR1 et CXCR2) par la réparixine diminue partiellement le comportement douloureux induit par les ACPA, se fixer au niveau de ses récepteurs spécifiques (CXCR1 et CXCR2) par la réparixine diminue partiellement le comportement activés par les ACPA, se fixer au niveau de ses récepteurs spécifiques (CXCR1 et CXCR2) présents au niveau des nocicepteurs articulaires conduisant à leur sensibilisation (**Figure 31 – partie gauche**) (Krishnamurthy *et al.*, 2016; Sokolove and Pisetsky, 2016; Wigerblad *et al.*, 2016; Catrina *et al.*, 2017). Néanmoins, ce mécanisme est peu susceptible d'être unique, la diminution de la douleur par la réparixine n'étant que partielle.

Nous proposons un autre mécanisme d'activation possible des fibres nociceptives par les ACPA. Celui-ci pourrait dépendre soit de la diminution locale du pH et/ou la libération d'autres facteurs tels que certains facteurs lipidiques (*i.e.* lysophosphatidylcholine) résultant de l'augmentation de l'activité ostéoclastique qui par la suite activeraient les canaux sensibles aux H⁺, particulièrement les canaux ASIC3 exprimés au niveau des fibres nociceptives. Nous ne pouvons pour le moment exclure un mécanisme d'activation directe des canaux ASIC3 par les ACPA même si cela semble peu probable (Jurczak, Barbier, Delay *et al.*, non publié). En effet, Wigerblad *et al.*, n'ont pas pu démontrer une augmentation de l'excitabilité neuronale des neurones de DRGs par les ACPA en utilisant des techniques d'imagerie calcique et de patch clamp.

Chapitre 2 : La douleur articulaire dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde | Introduction bibliographique



Figure 31 : Implication des ACPA dans le développement de l'arthralgie et dans l'amplification de la douleur articulaire

L'une des hypothèses repose sur la capacité des ACPA à se fixer au niveau des protéines citrullinées présentes au niveau des ostéoclastes. Ainsi, les ostéoclastes vont libérer de l'IL-8 qui pourra, d'une part, activer et/ou sensibiliser directement les nocicepteurs en se fixant aux récepteurs à l'IL-8 : les récepteurs CXCR1 et CXCR2. Cet aspect est présenté dans la partie gauche de cette figure et représente l'arthralgie induite par les ACPA. Mais l'IL-8 contribue secondairement à la chimioattraction des neutrophiles au niveau articulaire qui une fois stimulés par les autoanticorps (FR et/ou ACPA) vont libérer des NETs et participer à l'inflammation articulaire locale qui comme nous avons pu le voir précédemment, par la libération de différents médiateurs nociceptifs activeront les nocicepteurs. Cet aspect est présenté dans la partie droite de la figure (d'après **Catrina et al., 2016**).

ACPA : anticorps anti-protéines citrullinées, FcR : récepteur pour la partie constante des immunoglobulines, NETs : pièges extracellulaires des neutrophiles, RF : rheumatoid factor, IL : interleukine, CXCR : récepteur à l'interleukine 8

Il est intéressant de noter que les patients PR séronégatifs peuvent aussi présenter des signes d'arthralgie laissant supposer qu'il existe d'autres processus indépendants de la production du facteur rhumatoïde ou des ACPA (Molendijk, Hazes and Lubberts, 2018). D'autres autoanticorps ou des variations dans les profils cytokiniques pourraient être impliqués dans la mise en place de l'arthralgie chez ces patients.

1.2. Rôle potentiel des anti-CarP dans l'arthralgie

Outre le FR et les ACPA, nous avons pu voir que les anticorps anti-peptides carbamylés peuvent jouer un rôle dans la physiopathologie de la PR. La production d'anti-CarP ciblant l'homocitrullination des protéines est retrouvée dans près de 40% des patients présentant une arthralgie et indépendamment de la présence des ACPA ou du FR, et serait associée à un risque plus élevé de développer une PR (Shi *et al.*, 2013, 2014). Aucun lien n'a encore été établi entre les anti-CarP et l'arthralgie en tant que tel, mais on sait que l'homocitrullination est une réaction chimique dépendante du cyanate ; un métabolite provenant soit de la dégradation de l'urée, soit de la catalyse du thiocyanate en cyanate par l'enzyme myélopéroxydase (MPO) ou d'origine environnementale. Ainsi, suite à une exposition importante à un facteur environnemental entrainant l'augmentation de cyanate (*e.g.* fumée de véhicule industriel) ou à une augmentation de MPO (*e.g.* suite à l'initiation d'un processus

inflammatoire) qui conduit, par catalyse, à l'augmentation de cyanate, l'homocitrullination peut être augmentée et à partir d'un certain seuil conduire à la production d'anti-CarP. On peut aussi noter que les PR séronégatives présentent des altérations osseuses plus sévères au début de la pathologie (Barra *et al.*, 2013). Ainsi, il est possible que la production précoce d'anti-CarP puisse participer aux altérations osseuses et par conséquent jouer un rôle dans la douleur. Mais les anti-CarP ne sont retrouvés que chez 16% des patients PR séronégatives (Shi *et al.*, 2011) et ne peuvent donc pas expliquer l'ensemble des processus mis en jeu chez ces patients ne présentant ni FR, ni ACPA et ni anti-CarP.

1.3. Rôles des cytokines dans l'arthralgie

Plusieurs études ont pu mettre en évidence une altération précoce, des mois voire des années avant le diagnostic, des taux de cytokines et chimiokines dans la PR et notamment chez les patients présentant une arthralgie (Deane *et al.*, 2010; Kokkonen *et al.*, 2010; Chalan *et al.*, 2016).

Chalan *et al.*, (2016) ont étudié les profils sériques immuns chez des patients PR séronégatifs et séropositifs et chez des patients séropositifs ayant un haut risque de développer une PR. Les marqueurs immuns pour ces trois types de patients sont différents et discriminants. En effet, nous pouvons noter une augmentation spécifique de l'IL-5, MCP-1, MIP-1 α , IFN-1 α , TNF- α et IL-43 dans les PR séropositives, une augmentation spécifique de l'IL-10 et une diminution des molécules

chimiotactiques : l'éotaxine et RANTES (*i.e. Regulated on activation normal T cell expressed and secreted,* une cytokine de la famille des interleukines 8 aussi appelée CCL5) dans les PR séronégatives. Pour les patients séropositifs avec un haut risque de développer une PR, les profils inflammatoires sont similaires avec ceux d'une PR séropositive (Chalan *et al.,* 2016). Les différents profils pour chaque type de PR sont proposés dans l'encadré ci-contre.



Ces observations traduisent une activation précoce du système immunitaire, même si à un stade précoce, les taux de cytokines et chimiokines libérées sont bien moindre qu'au stade inflammatoire et établi de la PR. Les cytokines et chimiokines seraient tout de même capables de sensibiliser les nocicepteurs périphériques (voir 2.1) et par conséquent de participer au développement de l'arthralgie (Molendijk, Hazes and Lubberts, 2018). Par exemple, les concentrations en IL-5 et IL-17A sont augmentées chez des patients pré-PR et cette altération est retrouvée chez les patients PR-ACPA⁺ (Molendijk, Hazes and Lubberts, 2018).

De manière intéressante, il a été montré que l'axe IL-23/ T_H 17 est activé uniquement dans la phase prodromique de la PR bien avant la mise en place d'une synovite (Pfeifle *et al.*, 2017). L'IL-23 pourrait contrôler les profils de glycosylation des autoanticorps comme les ACPA et par conséquent leur pathogénicité. En outre, l'activation des T_H 17 va entrainer la libération de l'IL-17 capable d'activer la microglie et les astrocytes et donc de participer à une sensibilisation spinale précoce et donc au processus douloureux (Mifflin and Kerr, 2017). Ainsi, il pourrait exister un lien entre les ACPA, les profils cytokiniques et l'arthralgie.

2. La douleur articulaire chronique au stade de PR établie

L'évolution de la PR est marquée par le développement d'une synovite, qui, à partir d'un certain seuil, sera cliniquement détectable et définira le stade établi de la PR (**Figure 28**). Dans cette phase 75 à 80% des patients présentent une douleur chronique modérée à sévère (Taylor *et al.*, 2010). Lorsque la douleur se chronicise, elle devient une pathologie en tant que telle marquée par une sensibilisation à la fois périphérique et centrale qui entretient sa chronicité (Kuner and Flor, 2017). Ces processus relèvent d'une plasticité neuronale à l'origine du développement de douleurs spontanées (*i.e.* douleurs ressenties en l'absence de stimulus spécifique) ou provoquées (*i.e.* douleurs ressenties en présence d'un stimulus mécanique, thermique ou chimique).

La douleur provoquée fait appel à deux notions, que sont l'hyperalgie et l'allodynie (Hardy, Woolf and Goodell, 1950). L'hyperalgie est définie initialement comme une amplification de la sensation douloureuse à un stimulus nociceptif alors que l'allodynie correspond à une douleur ressentie en présence d'un stimulus normalement non nociceptif. Ces deux mécanismes mettent en jeu des mécanismes neuronaux à priori différents. On peut ajouter à ces deux mécanismes une notion de localisation. Ainsi, l'hyperalgie sera nommée « primaire » lorsqu'elle sera ressentie au niveau du site de la lésion, « secondaire » lorsqu'elle sera perçue dans une zone proche de la lésion et « diffuse » si elle est ressentie à distance. L'hyperalgie primaire fait intervenir des mécanismes directement associés à la sensibilisation périphérique alors que l'hyperalgie secondaire est diffuse et fait intervenir des mécanismes de sensibilisation centrale.

Dans la PR, la douleur articulaire reste plutôt stable sur un bilan de plusieurs années mais elle peut varier en fonction des semaines ou des mois avec des phases de douleur épisodique et de douleur constante qui présentent des caractéristiques qui leur sont propres (Roche, Klestov and Heim, 2003; Walsh and McWilliams, 2014; Bas *et al.*, 2016). Ces douleurs articulaires peuvent survenir soit suite à une stimulation mécanique de l'articulation (*e.g.* appui, application d'une pression, mouvement articulaire), soit spontanément au repos. Elles peuvent être associées à des mécanismes par excès de nociception notamment dans les phases inflammatoires actives mais peuvent aussi se présenter comme des douleurs neuropathiques (McWilliams and Walsh, 2017). Ainsi, la douleur articulaire dans la PR au stade établi semble dépendre de mécanismes de sensibilisation à la fois périphérique et centrale et, pour certains patients d'une composante neuropathique. Chacun de ces mécanismes seront développés par la suite.

2.1. Sensibilisation périphérique

Les nocicepteurs présentent une plasticité fonctionnelle qui leur donne la capacité d'être sensibilisés en condition pathologique (Coggeshall *et al.*, 1983; Schaible and Schmidt, 1983, 1985). Cette sensibilisation périphérique relève de plusieurs mécanismes : (1) l'augmentation de l'activité spontanée des nocicepteurs, (2) la diminution du seuil d'activation des fibres nociceptives, (3) l'activation de nocicepteurs « silencieux » normalement quiescents et (4) l'augmentation de la réponse à des hyperstimuli (*i.e.* stimuli qui provoque une réaction exagérée de l'organisme) (Meeus *et al.*, 2012).

Si l'on s'intéresse à la sensibilisation périphérique dans un contexte de PR établie, nous savons que la genèse et le maintien de la sensibilisation périphérique des terminaisons nerveuses des fibres nociceptives sont notamment associés à l'environnement inflammatoire articulaire (Meeus *et al.*, 2012). En effet, la synovite caractéristique d'une PR est marquée par la production et la libération de différents médiateurs comme des lipides bioactifs (*e.g.* prostaglandines, leucotriènes), kinines (*e.g.* bradykinine), cytokines (*e.g.* IL-1, IL-6, TNF...), neuropeptides (*e.g.* CGRP), neuromédiateurs (*e.g.* sérotonine) et de neurotrophines comme le *Nerve Growth Factor* ou NGF formant une « soupe inflammatoire » (Patrick W Mantyh, 2014; McWilliams and Walsh, 2017). Ces médiateurs vont activer leurs récepteurs spécifiques (*e.g.* IL-1R, TNFR, TrkA...) au niveau des nocicepteurs puis les voies de signalisations intracellulaires qui leur sont associées ou moduler l'activité de certains canaux ioniques (*e.g.* TRPV1, TRPA1, Na_v...) et ainsi moduler l'activité des nocicepteurs (**Figure 32**) (Pinho-Ribeiro, Verri and Chiu, 2017). Le rôle clé du NGF dans la douleur, notamment inflammatoire, sera développé dans une prochaine partie (CHAPITRE 3 : II.).

La sensibilisation périphérique est aussi marquée par des modifications au niveau des corps cellulaires des nocicepteurs présents au niveau des DRGs qui sera le lieu de modifications d'expression génique de canaux ioniques, récepteurs ou de modifications post-traductionnelles capables de moduler la cinétique de la réponse nociceptive ou l'adressage membranaire des différents récepteurs (Woolf and Ma, 2007). Ainsi, l'activité spontanée des nocicepteurs sera augmentée et le seuil d'activation des fibres nociceptives diminué.



Figure 32 : Médiateurs de la sensibilisation périphérique

Durant l'inflammation, les médiateurs sécrétés par les cellules du système immunitaire participent, en se liant à leur récepteurs spécifiques présents au niveau des nocicepteurs articulaires, à la sensibilisation périphérique (d'après **Pinho-Ribeiro et al., 2017**).

IL : interleukine, 5-HT : sérotonine, NGF : nerve growth factor, LTB₄ : leucotriène B4, TNF : tumor necrosis factor, PGE₂ : prostaglandine E₂, H1/2 : récepteur à l'histamine 1 et 2, TrkA : récepteur tyrosine kinase A, gp130 : glycoprotéine 130, EP : récepteur aux prostaglandines, Na_v : canaux sodiques voltage dépendants, TRP : transient receptor potential

Outre leurs rôles dans l'arthralgie, les ACPA pourraient, en participant à la réponse inflammatoire, promouvoir la sensibilisation périphérique impliquée dans la douleur chronique inflammatoire retrouvée dans une PR (Figure 31 - partie droite - page 64) (Catrina et al., 2017). Cette action pro-inflammatoire des ACPA peut d'une part dépendre de son action sur les ostéoclastes et de la libération de l'IL-8. En effet, l'IL-8 est capable de recruter et de stimuler la différenciation des neutrophiles au niveau du synovium qui vont former des pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs) puis induire une NETose. Les NETs sont connus pour augmenter la réponse inflammatoire (Khandpur et al., 2013). D'autre part, les ACPA peuvent venir se lier au niveau d'histones citrullinées (cH2A et cH2B) qui sont externalisées dans le mécanisme de NETs et qui forment des autoantigènes avec une capacité innée immuno-stimulatrice (Sohn et al., 2015). Ainsi, la réponse immune est stimulée, la libération de médiateurs inflammatoires augmentée et la sensibilisation périphérique amplifiée. De plus, les ACPA, mais aussi le FR, formant des complexes immuns circulants, peuvent promouvoir l'inflammation locale par le contact entre ces complexes et les macrophages conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα (Clavel et al., 2008). Enfin, l'activation du système immunitaire innée au niveau des cellules synoviales comme les macrophages ou les FLS augmente l'activité des PADs et par conséquent la citrullination des protéines (Catrina et al., 2017). Ainsi, le nombre de cibles citrullinées pour les ACPA augmente, ce qui pourra, au final, amplifier la sensibilisation périphérique.

La sensibilisation périphérique est aussi marquée par l'activation de récepteurs normalement non activables en condition physiologique que sont les nocicepteurs « silencieux » (McMahon and Koltzenburg, 1990; Michaelis, Häbler and Jäenig, 1996). Ils correspondent à une sous population de fibres C sensitives présente en quantité importante dans l'ensemble des structures articulaires, excepté le cartilage. Lors d'une arthrite caractéristique de la PR, ces nocicepteurs silencieux vont devenir mécano-sensibles et participer à augmenter la douleur ressentie par les patients (McDougall, 2006; Nagy, Lukacs and Urban, 2006). De plus, les fibres afférentes primaires A β qui répondent normalement à des stimuli tactiles non nocifs peuvent durant une inflammation chronique comme dans la PR établie, participer au maintien à long terme de l'allodynie (Meeus *et al.*, 2012).

Outre ces mécanismes, la PR se caractérise par la formation d'un œdème qui entraine un déséquilibre des forces de Starling. L'augmentation liquidienne dans l'environnement articulaire clos va entrainer une augmentation de la pression intra articulaire induisant une pression mécanique plus intense au niveau des nocicepteurs participant, elle aussi, à la sensibilisation périphérique (McDougall, 2006).

La douleur inflammatoire peut aussi faire intervenir ce qu'on appelle une inflammation neurogène. Ce mécanisme correspond à la libération par les fibres afférentes primaires nociceptives de médiateurs capables de sensibiliser les nocicepteurs eux-mêmes, provoqué par le réflexe d'axone (Basbaum, 2009). Ce réflexe axonal est marqué par une transmission bidirectionnelle des potentiels d'action : lorsqu'un PA atteint un point de branchement d'un champ récepteur, il est envoyé en retour vers la périphérie. Cela conduit à la libération rapide de neuropeptides (*e.g.* CGRP, SP) et de neurotransmetteurs qui *via* les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses au niveau des vaisseaux sanguins participeront à l'influx de cellules immunitaires et donc à entretenir la synovite et la sensibilisation périphérique (Talbot, Foster and Woolf, 2016). Ce lien entre inflammation et neurones sensoriels est renforcé par le fait que les patients présentant une dénervation de certains tissus sont moins susceptibles de développer une pathologie inflammatoire comme une PR dans ces tissus. Ainsi, cette dénervation pourrait jouer un rôle protecteur (Talbot, Foster and Woolf, 2016).

2.2. Sensibilisation centrale

Outre une sensibilisation périphérique, les patients PR présentent une sensibilisation centrale qui résulte (1) d'un défaut dans les systèmes inhibiteurs de contrôles, (2) d'un mécanisme de *wind-up* et (3) d'une sur-activation des voies descendantes facilitatrices de la douleur (Meeus *et al.*, 2012). Cette sensibilisation centrale est définie par l'I.A.S.P. comme une « augmentation de la réponse des neurones nociceptifs au niveau du SNC à des stimuli normaux ou inférieurs à leur seuil d'activation ». Ce mécanisme est connu depuis les années 1980s et amplifie la perception et la sévérité de la douleur ressentie (Woolf, 1983).

La sensibilisation centrale peut relever d'un défaut des systèmes inhibiteurs de contrôle. Parmi ces systèmes, il semble que dans la PR, les contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive (CIDN) ne soient pas modifiés (Leffler *et al.*, 2002) mais la mesure de la modulation de la douleur conditionnée (MDC) (*i.e.* mesure globale de l'inhibition de la douleur pouvant impliquer différents mécanismes à la fois inhibiteurs et excitateurs) est diminuée chez des patients PR (Lee, 2013).

L'une des composantes de la sensibilisation centrale est une sensibilisation spinale ou réflexe spinal que l'on nomme *wind-up* qui met en jeu principalement le glutamate et ses récepteurs spécifiques *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA). Décrit pour la première fois par Mendell en 1965, ce phénomène de *wind-up* ou d'embrasement correspond à une augmentation progressive et fréquence dépendante de la réponse des fibres C de la corne dorsale de la moelle épinière aux stimulations répétitives (plus précisément aux potentiels post-synaptiques excitateurs) (Mendell and Wall, 1965; Herrero, Laird and López-García, 2000). Chez l'Homme, la mesure du « seuil de douleur à la pression » ou PPT pour *Pressure Pain Threshold* constitue un paramètre essentiel pour évaluer les dysfonctionnements du musculosquelette et sa mesure répétée pourrait constituer une évidence indirecte d'un mécanisme de sommation temporel (Meeus *et al.*, 2012). Quelques études ont pu mettre en avant une diminution du PPT dans la PR suite à sa mesure répétée laissant supposer un mécanisme de *wind-up* dans la PR (Dhondt *et al.*, 1999; García-Fernández *et al.*, 2009). Chez l'animal, l'induction d'une monoarthrite par l'injection de CFA induit un mécanisme de *wind-up* et le développement d'une hyperexcitabilité des neurones WDR de la moelle épinière (Aby *et al.*, 2018).

Comme présenté dans la **Figure 33** et pour faire suite au processus initié en périphérie, la sensibilisation centrale est marquée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière par la libération de neuromédiateurs comme la SP ou le BDNF et de neurotransmetteurs tel que le glutamate par les terminaisons centrales des fibres afférentes primaires dans la fente synaptique. Ces neuromédiateurs et neuromodulateurs vont se lier à leur récepteurs spécifiques, le récepteur à la neurokinine 1 couplé aux protéines G pour la SP, le récepteur tyrosine kinase B pour le BDNF et les récepteurs ionotropiques NMDA et AMPA pour le glutamate ou encore les récepteurs métabotropiques au glutamate (non représentés) présents au niveau du neurone de second ordre. Lorsque les taux de SP, BDNF, CGRP sont assez élevés, ils pourront induire une dépolarisation membranaire du neurone post-synaptique de second ordre assez importante pour permettre une levée de l'inhibition du récepteur NMDA par le Mg²⁺ et la genèse d'un courant entrant et d'un influx de Ca²⁺ par l'activation du récepteur NMDA par le glutamate (Westlund, 2006; Latremoliere and Woolf, 2009; Mantyh *et al.*, 2011). Ces influx ioniques associés à des changements d'activité transcriptionnelle conduiront *in fine* à l'activation de nombreuses voies intracellulaires maintenant la sensibilisation centrale.



Figure 33 : Sensibilisation centrale

Dans la polyarthrite rhumatoïde et notamment dans la phase inflammatoire, l'augmentation de l'expression de la SP, du CGRP, du BDNF ou du glutamate et de leur libération dans la fente synaptique va induire une importante dépolarisation membranaire du neurone de projection de second ordre. Ainsi, l'inhibition des récepteur NMDA par le Mg²⁺ sera levée et *in fine* les influx ioniques seront capables de moduler l'expression génique et promouvoir la sensibilisation centrale (d'après **Mantyh et al., 2011**).

SP : substance P, **CGRP** : calcitonine-gene related peptide, **BDNF** : brain-derived neurotrophic factor, **NK-I** : neurokinine I, **TrkB** : récepteur tyrosine kinase B, **NMDA** : *N*-méthyl-D-aspartate, **AMPA** : amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate

La sensibilisation centrale dans la PR semble être aussi liée à une activation gliale (Mifflin and Kerr, 2017). La microglie et les astrocytes activés pourront produire des cytokines (*e.g.* TNF-α, IL-1, IL-6) au niveau de la moelle épinière et participer à la sensibilisation spinale et par conséquent au maintien du statut hyperalgique (Zhang and An, 2007; Sarzi-Puttini *et al.*, 2014; Mifflin and Kerr, 2017).

Enfin, une sensibilisation cognitivo-émotionnelle peut entrer en jeu dans cette sensibilisation centrale. Ce mécanisme résulte de l'activation des structures impliquées dans la cognition, les émotions, l'attention et la motivation (Meeus *et al.*, 2012).

2.3. Composante neuropathique de la douleur articulaire

Les douleurs neuropathiques se caractérisent notamment par des sensations de brûlure, une sensation de froid douloureux et/ou des crises soudaines assimilables à des chocs électriques. L'utilisation du questionnaire DN4 (*i.e.* questionnaire pour estimer la probabilité d'une douleur neuropathique [Bouhassira *et al.*, 2005]) chez des patients PR au stade établi a permis d'évaluer à 35,7% le nombre de patients PR présentant une douleur de type neuropathique (Perrot *et al.*, 2013). Dans une étude plus restrictive, avec l'utilisation du questionnaire *PainDETECT*, le pourcentage de patient PR n'était que de 18% (Garip *et al.*, 2015).

Ainsi, la proportion de personnes présentant des douleurs semblables à des douleurs neuropathiques dans la PR est non négligeable et peut être due à des mécanismes de compression (*e.g.* syndrome du tunnel carpien), aux comorbidités associées (*e.g.* diabète de type II), à une vascularite ou encore aux traitements thérapeutiques utilisées (*e.g.* léflunomide) (McWilliams and Walsh, 2017).

En outre, plusieurs études chez l'animal, supportent le concept d'une composante neuropathique dans la PR qui se traduit par la présence d'une néoinnervation ou *sprouting* de fibres sympathiques au niveau du *synovium* articulaire et de la peau adjacente, et de fibres nociceptives myélinisées NF200⁺ et non myélinisées peptidergiques CGRP⁺ au niveau de la membrane synoviale (Longo, Osikowicz and Ribeiro-da-Silva, 2013). Cette néoinnervation fait notamment intervenir le NGF comme le montre la **Figure 34** (Ghilardi *et al.*, 2012).



Figure 34 : Néoinnervation des fibres sensorielles au niveau du synovium suite à l'injection de CFA

Images confocales montrant une néoinnervation (GAP43⁺) des fibres nerveuses sensorielles afférentes primaires peu ou non myélinisées (CGRP⁺), myélinisées (NF200⁺) au niveau du synovium d'articulations de souris injectées avec du CFA. Cette néoinnervation est bloquée par un anti-NGF (extrait de l'article de **Ghilardi et al., 2012**).

Enfin, les fibres nerveuses sympathiques peuvent constituer des contacts anormaux entre les axones formant ce qu'on appelle des éphapses (*i.e.* synapse électrique sans neuromédiateur chimique) capables de promouvoir l'hyperexcitabilité neuronale (Bera-Louville, 2003). Il existe donc une composante neuropathique chez certains patients souffrant de PR, rendant plus complexe la prise en charge de leur douleur.

IV. Problématique actuelle : le manque d'innovation thérapeutique : d'une meilleure compréhension des mécanismes vers l'innovation

Comme nous avons pu le voir dans ces deux premiers chapitres, la douleur est un des symptômes principaux de la PR. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent principalement à diminuer l'activité de la pathologie et sa progression et n'ont finalement que relativement peu d'impact sur la diminution de la douleur ressentie des patients. Les mécanismes à l'origine de la douleur dans la PR sont multiples et dépendent du stade de la pathologie. Concernant le stade précoce de la PR, nous pensons qu'une meilleure compréhension de la nature de la relation entre les autoanticorps (ACPA) produits précocement dans la PR et les nocicepteurs pourrait ouvrir vers de nouvelles pistes d'exploration thérapeutique pour traiter l'arthralgie. Enfin, nous avons aussi pu mettre en évidence la multiplicité des évènements mis en jeu dans la douleur chronique articulaire au stade établi de la pathologie. Parmi tous les médiateurs sécrétés durant cette phase inflammatoire, le *Nerve growth factor* nous a particulièrement intéressé et fera l'objet du troisième chapitre de ce manuscrit.

CHAPITRE 3 :

Le facteur de croissance des nerfs ou Nerve Growth Factor

I. Généralités sur les neurotrophines

Les neurotrophines (NT) constituent une famille de protéines sécrétées comprenant 4 membres chez les mammifères : (1) le *Nerve Growth Factor* ou NGF, (2) le *Brain-Derivated Neurotrophic Factor* ou BDNF, (3) la neurotrophine 3 ou NT3 et (4) la neurotrophine 4/5 ou NT4/5. D'autres membres ont été découverts mais ne sont présents que chez les poissons : les neurotrophines 6 et 7 (NT6 et NT7). Ces différentes formes de NT possèdent une forte homologie de séquence dans leur structure primaire et possèdent des propriétés chimiques et structurales communes.

1. Découvertes des neurotrophines

La première neurotrophine à avoir été découverte est le NGF par Levi-Montalcini et Hamburger dans les années 1950s. Suite à l'implantation d'un fragment de sarcome de souris au niveau d'embryon de poulet, ils avaient pu mettre en évidence un phénomène de croissance neuronale et faire l'hypothèse qu'un agent soluble, libéré par le sarcome, était capable de promouvoir la croissance de certains types de fibres nerveuses (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). Cet agent, le NGF, fut par la suite purifié par Cohen en 1960 à partir de glandes sous-maxillaires de souris (Cohen, 1960). Ces découvertes ont conduit à l'attribution du Prix Nobel de Médecine en 1986. La **Figure 35** illustre la croissance nerveuse induite par le NGF sur un ganglion spinal (Levi-Montalcini and Booker, 1960). La deuxième neurotrophine à avoir été isolée est le BDNF en 1982 à partir de cerveau de porc (Barde, Edgar and Thoenen, 1982) puis clonée en 1989 (Leibrock *et al.*, 1989). La neurotrophine 3 fut identifiée et caractérisée qu'en 1990 (Hohn *et al.*, 1990; Jones and Reichardt, 1990; Rosenthal *et al.*, 1990) et un an plus tard, ce fut la neurotrophine 4 (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallböök, Ibáñez and Persson, 1991).



Figure 35 : Micrographies de cultures *in vit*ro de ganglions rachidiens de la moelle épinière cultivés en présence ou non de NGF

La partie gauche, notée 2 représente un ganglion de fœtus humain de 2 mois et demi cultivé dans un milieu de culture standard. La partie droite, notée 3, représente un ganglion de souris cultivé pendant 24 heures en présence de NGF. Cette micrographie met en avant la formation d'un halo fibrillaire autour du ganglion de souris traduisant une croissance nerveuse importante suite au traitement avec du NGF (protéine salivaire purifiée à la concentration 1 : 18 000). Dans l'article source, il est précisé que les ganglions humains ou murins réagissent de la même manière au facteur de croissance (d'après **Levi-Montalcini & Booker, 1960**).

1.1. Synthèses des neurotrophines

Comme présenté dans la **Figure 36**, les NT sont synthétisées sous forme de pré-proneurotrophine puis de pro-neurotrophine. Les pro-NT font environ 30 kDa et sont capables de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser. Elles possèdent des fonctions différentes par rapport à leurs formes matures. Les formes matures des NT font environ 13kDa et sont générées par des mécanismes intracellulaires ou extracellulaires et sont sécrétées au niveau des tissus périphériques ainsi qu'au niveau du système nerveux central (Pezet *et al.*, 2014; Al-Qudah and Al-Dwairi, 2016; Pramanik, Sulistio and Heese, 2017).



Figure 36 : Synthèse et sécrétion des neurotrophines

Les ARNm des NT sont synthétisés sous une forme de pré-pro-neurotrophine par les ribosomes attachés au réticulum endoplasmique rugueux. A leur sortie, la pré-séquence est directement clivée par une peptidase générant une forme proprotéique. Les pro-NT sont transportées au niveau de l'appareil de Golgi de la face cis vers la face trans où elles seront ensuite libérées dans le cytosol. Les NT matures seront générées soit par des processus intracellulaires indépendant ou dépendant du calcium mettant en jeu des furines, soit par un processus extracellulaire catalysé par la plasmine (d'après **Pramanik et al., 2017**).

1.2. Récepteurs aux neurotrophines

Les neurotrophines peuvent se lier à deux types de récepteurs transmembranaires : (1) les récepteurs de haute affinité tyrosines kinases ou *Tropomyosin-related kinase* : Trks, comprenant plusieurs isoformes : TrkA, TrkB et TrkC avec chacun une spécificité de liaison à un type de neurotrophine et (2) le pan récepteur aux neurotrophines p75^{NTR}, de la superfamille des facteurs de nécrose tumoral (TNFR) qui lie l'ensemble des NT et leur forme pro-protéique. Le NGF se lie et active avec une forte affinité le récepteur TrkA, le BDNF et la NT4/5, le récepteur TrkB et la NT3, le récepteur TrkC (**Figure 37**) (Kaplan, Martin-Zanca and Parada, 1991; Klein *et al.*, 1991). Notons que la NT3 a la particularité de pouvoir se lier avec une très faible affinité à la fois à TrkA et TrkB à certains stades du développement et notamment lors de la phase embryonnaire.

Outre l'activation des récepteurs Trk par leurs ligands respectifs, ces récepteurs peuvent être activés par un mécanisme de transactivation par les récepteurs couplés aux protéines G et en

particulier le récepteur TrkA. En effet, TrkA est activé suite à un traitement des cellules PC12 par l'adénosine, en absence de neurotrophines (Lee and Chao, 2001). Cet effet résulte de l'activation par l'adésonine de son récepteur A_{2A} couplé à une protéine G_S puis subséquemment des voies de signalisation comme PI3K-Akt, démontrant l'induction de signalisation neurotrophine-indépendante (Lee and Chao, 2001).



Figure 37 : Les neurotrophines et leurs récepteurs

Les neurotrophines se lient avec une forte affinité à l'un des récepteurs à activité tyrosine kinase : le NGF au TrkA, le BDNF et la NT4 au TrkB et la NT3 au TrkC et avec une plus faible affinité sur le pan récepteur aux neurotrophines le p75^{NTR} qui est aussi capable de lier les formes pro-NT (adaptée de **Chao et al., 2003**).

Trk : récepteur tyrosine kinase, NT : neurotrophine, CD : chopper domain, DD : death domain

1.3. Rôles des neurotrophines

Concernant les rôles des neurotrophines dans l'organisme, elles ont, à l'origine, été caractérisées pour leur action en tant que facteur de survie sur les neurones du système nerveux sympathique et sensoriel (Skaper, 2012). Chacune des neurotrophines possède ses propres caractéristiques fonctionnelles qui seront développées par la suite. Le NGF sera abordé avec plus de précision dans une prochaine partie (CHAPITRE 3 : I. 2).

1.3.1 Le BDNF

Le BDNF est la neurotrophine la plus exprimée au niveau du SNC et est impliquée dans de nombreux mécanismes associés au développement du système nerveux et dans les processus cognitifs (Park and Poo, 2013; Hempstead, 2015). Par exemple, des études de délétion du gène *Bdnf* chez la souris (Jones *et al.*, 1994) ou de cultures de cellules souches en présence de BDNF (Ahmed, Reynolds and Weiss, 1995) ont pu mettre en évidence son rôle dans la différenciation neuronale plutôt que dans la survie (Rauskolb *et al.*, 2010). De plus, le BDNF est à la fois un modulateur et un médiateur des fonctions synaptiques où il est notamment impliqué dans la potentialisation à long terme ou LTP (*i.e.* processus biologique par lequel la stimulation tétanique à haute fréquence, entraine une augmentation de manière durable de la transmission synaptique) qui est un substrat neurobiologique de la mémorisation (Park and Poo, 2013). Des déficits en BDNF au niveau de l'hippocampe (Korte *et al.*, 1995) peuvent expliquer, en partie, les déficits dans les tâches de mémorisation présents chez les souris hétérozygotes *Bdnf*^{+/-} ou *knockout Bdnf*^{-/-} (Meis *et al.*, 2018) via des mécanismes à la fois pré- et/ou post-synaptique.

Chez l'Homme, un polymorphisme nucléotidique (SNPs 6265) a été identifié pour le gène du *BDNF* correspondant à une valine en position 66 remplacée par une méthionine, on parle de *BDNF* val66met (Egan *et al.*, 2003). Ce polymorphisme est associé à plusieurs troubles pathologiques comme des pertes de mémoires épisodiques associées à une activation anormale de l'hippocampe (Egan *et al.*, 2003), une prédisposition chez le jeune adolescent à des désordres bipolaires (Geller *et al.*, 2004), des troubles de l'anxiété (Soliman *et al.*, 2010), au stress chez l'enfant (Bîlc *et al.*, 2018) et peut être aussi retrouvé dans plusieurs pathologies neurodégénératives comme la pathologie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou le glaucome (Shen *et al.*, 2018) (<u>http://omim.org/entry/113505</u>, accès le 22/07/2018).

Enfin, le BDNF joue un rôle important dans la douleur avec une action à la fois pro- ou antinociceptive, bien que ce dernier ne soit pas clairement démontré. Il est synthétisé constitutivement par 10 à 40% des neurones peptidergiques de petite et moyenne tailles des DRGs, classifiés comme nocicepteurs (Pezet and McMahon, 2006). Son rôle pro-nociceptif passe notamment par un rôle modulateur dans la sensibilisation centrale en condition inflammatoire (Zhao *et al.*, 2006). La libération de NGF durant l'inflammation, par exemple, va stimuler l'expression des transcrits ARN et protéiques du BDNF au niveau des DRGs et des terminaisons spinales des neurones sensoriels. L'activation de TrkB et de ses voies de signalisation en aval (*e.g. Mitogen Activated Protein* kinases ERK, PLC, PKC...) par le BDNF au niveau spinal, va entrainer la phosphorylation des récepteurs NMDA au glutamate et donc augmenter les courants excitateurs associés à ces récepteurs (Kerr *et al.*, 1999; Pezet and McMahon, 2006). Le BDNF est aussi dérégulé dans les neurones sensoriels en contexte neuropathique. De plus, le BDNF semble participer à la transition entre douleur aiguë et douleur chronique (Sikandar *et al.*, 2018). Enfin, outre son rôle pro-nociceptif, le BDNF présente des propriétés pharmacologiques antinociceptives qui pourraient être médiées par la libération spinale d'acide-γ aminobutyrique (GABA) et l'inhibition des neurones de transmission (Pezet *et al.*, 2002; Pezet and McMahon, 2006).

1.3.2 La neurotrophine 3

La NT3 participe au développement cardiaque (Palko, Coppola and Tessarollo, 1999), au développement des afférences proprioceptives (Ernfors *et al.*, 1994), induit la croissance et la survie

neuronale (Kalcheim, Carmeli and Rosenthal, 1992) et joue un rôle dans la myélinisation des cellules (Chan *et al.*, 2001; Cosgaya, Chan and Shooter, 2002).

Les souris *knockout* pour les gènes de la neurotrophine 3 (*Nt3*-/-) ou de son récepteur spécifique TrkC (*TrkC*-/-) présentent des phénotypes en partie distincts. Ces souris possèdent, toutes les deux, des défauts dans la proprioception et donc dans leur posture et la mise en mouvement mais, par exemple, les souris *Nt3*-/- perdent jusqu'à 70% de leurs neurones sensoriels au niveau des DRGs alors que les souris *TrkC*-/- n'en perdent que 20 à 35% (Coppola *et al.*, 2001). Ceci démontre un rôle important de la NT3 dans la survie neuronale au stade embryonnaire par sa liaison aux autres récepteurs à activité tyrosine kinase.

Malgré un rôle principalement dans la modulation de la proprioception, la NT3 semble jouer un rôle pro- et anti-nociceptif. Concernant le rôle pro-nociceptif de la NT3, il ne semble pas dépendre de la sensibilisation des fibres afférentes primaires nociceptives (Shu and Mendell, 1999) mais plutôt de mécanismes spinaux. En effet, l'injection intrathécale de NT3 pendant 20 jours est capable d'induire une allodynie mécanique au niveau de la patte chez le rat 10 à 20 jours après la première dose injectée (White, 1998). Par contre, une injection locale au niveau de la patte de NT3 n'est pas capable d'induire d'hyperalgie mécanique (Watanabe *et al.*, 2000). Dans cette dernière étude, la NT3 jouerait plutôt un rôle inhibiteur sur l'hypersensibilité mécanique en diminuant de manière transitoire la douleur induite par l'injection intra-plantaire de CFA (Watanabe *et al.*, 2000). Cet effet anti-nociceptif de la NT3 est d'ailleurs bien mieux documenté avec des preuves plus fortes que son effet pro-nociceptif et semble affecter principalement les douleurs neuropathiques périphériques et centrales (Khan and Smith, 2015). Par exemple, dans un modèle de neuropathie périphérique induit par la ligature du nerf sciatique, l'injection intrathécale de NT3 prévient et atténue spécifiquement l'hyperalgie thermique sans effet sur l'hyperalgie mécanique. Cet effet pourrait dépendre d'une régulation négative de l'expression du NGF par la NT3 (Wilson-Gerwing *et al.*, 2008).

1.3.3 Les neurotrophines 4/5

La délétion du gène *Nt4* chez la souris (*Nt4*-/-) ne conduit pas à la perte de neurones sensoriels et les souris ne présentent pas de problèmes morphologiques majeurs (Conover *et al.*, 1995). La NT4 est exprimée au niveau du muscle et semble jouer un rôle dans la réponse bidirectionnelle au niveau de la jonction neuromusculaire (Carrasco and English, 2003). Le rôle des voies NT4/TrkB dans la nociception n'est pas clair, certains auteurs affirment qu'elles ne jouent pas de rôle dans sa modulation (Yajima *et al.*, 2002) mais d'autres ont montré qu'elles seraient impliquées dans l'analgésie aux opioïdes (Lucas *et al.*, 2003). Chez l'Homme, une mutation du gène de la NT4 est seulement associée au glaucome à angle ouvert (Pasutto *et al.*, 2009).

2. Le facteur de croissance des nerfs - Nerve growth factor - NGF

2.1. Structure et synthèse

Isolé et purifié à partir de glandes salivaires sous-maxillaires murines, le NGF est un complexe de haut poids moléculaires (de 130 à 140 kDa) appelé le complexe 7S (i.e. coefficient de sédimentation exprimé en svedberg (S)) comprenant plusieurs sous-unités α , β et γ généralement de stœchiométrie $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ (**Figure 38**). Seule, la sous-unité β , aussi appelée 2,5S-NGF, constituée d'un dimère \u03c61-\u03c62, possède l'activité neurotrophique et est inactive au sein du complexe 7S (Varon, Nomura and Shooter, 1967; Bax et al., 1997). II faut noter que cette forme 7S du NGF n'est présente que dans les glandes salivaires chez la souris et nous nous intéresserons par la suite qu'au β-NGF qui sera nommé simplement NGF.



Figure 38 : Structure du complexe 7S-NGF

Le complexe 7S-NGF comprend 2 sous-unités α (α_1 et α_2), 2 sous-unités β (β_1 et β_2) et 2 sous-unités γ (γ_1 et γ_2). L'interaction entre les sous-unités $\gamma_1 _{ou 2}$ et $\alpha_1 _{ou 2}$ est médiée par la présence d'ions zinc (d'après **Bax et al., 1997**).

Le gène codant le *NGF* est retrouvé au niveau des chromosomes 3 chez la souris, 2 chez le rat et 1 chez l'Homme. Les études chez la souris ont mis en évidence 4 transcrits différents (A, B, C et D dont les deux majeurs sont A et B) résultant de la présence de deux promoteurs différents et de mécanismes d'épissage alternatif, chacun d'entre eux contenant l'exon codant pour la séquence du NGF mature (l'exon n°4) (Edwards, Selby and Rutter, 1986; West, Pruunsild and Timmusk, 2014).

2.2. La signalisation par le NGF

Seul, le NGF, n'est pas capable d'initier une signalisation (Mantyh *et al.*, 2011). Pour en induire une, il doit se lier à un récepteur. Sa forme mature est ainsi capable de se lier à deux types de récepteurs avec une affinité différente : avec une forte affinité (K_d=10⁻¹⁰ M) au récepteur TrkA et une plus faible affinité (K_d=10⁻⁹ M) au récepteur p75^{NTR}. Sa forme pro-protéique se lie uniquement au récepteur p75^{NTR}. La **Figure 39** présente les différents dimères (homo ou hétéro) de récepteurs sur lesquels le NGF mature ou sa forme pro-protéique peuvent se lier.



Figure 39 : Liaison du NGF à ses différents récepteurs

Le NGF peut se fixer au niveau d'un homodimère de récepteur TrkA ou hétérodimère des récepteurs TrkA et p75 ou d'un complexe p75^{NTR}/Sortiline. Ce dernier possède une affinité importante pour le pro-NGF plutôt que le NGF mature (d'après **Denk, Bennett & McMahon, 2017**).

CD : domaine catalytique, DD : death domain ou domaine de mort, P : phosphorylation, trkA : récepteur tyrosine kinase A, NGF : nerve growth factor, p75^{NTR} : pan neurotrophine récepteur 75

2.2.1 *Le récepteur TrkA*

a. Structure et expression du récepteur TrkA

Le récepteur TrkA est codé par le gène *TRKA* pour *tropomyosin-related kinase* de nom officiel récepteur neurotrophique tyrosine kinase de type 1 ou *NTRK1*. Présent chez l'Homme au niveau du chromosome 1, il fait 23 kb et comporte 17 exons (Indo *et al.*, 1997). La partie extracellulaire du récepteur TrkA est codée par les exons 1 à 10 du gène *NTRK1*. Elle comprend les sites de liaison du ligand et peut subir des modifications post-traductionnelles de type glycosylation, qui joueront un rôle important dans la signalisation et la localisation du récepteur. Par exemple, la perte de glycosylation peut entrainer une autophosphorylation du récepteur le rendant constitutivement actif. La partie transmembranaire est codée par l'exon 11 et la partie intracellulaire de TrkA est codée par les exons 12 à 17 du gène *NTRK1*. Il existe trois isoformes du récepteur TrkA (TrkA I, TrkA II et TrkA III) résultant d'un épissage alternatif du gène *NTRK1* chez l'Homme. TrkA II constitue l'isoforme complet et est exprimé dans les tissus nerveux alors que TrkA I est exprimé dans les tissus non-neuronaux. L'isoforme TrkA III n'est pas apte à lier le NGF et est activé de manière constitutive, mais son expression reste limitée (*e.g.* en condition d'hypoxie, au niveau des géniteurs neuraux précoces non différenciés ou au niveau du thymus). Deux autres formes sont décrites chez le rat : TrkA L0 et TrkA L1 (Luberg *et al.*, 2015).

TrkA est exprimé dans de nombreux organes et tissus du SNP, du SNC, du tractus digestif, au niveau du cortex surrénalien, de la prostate, de l'utérus, des reins et de la peau (Hirose, Kuroda and Murata, 2016). Son expression va varier en fonction du stade de développement avec par exemple une expression presque totale dans toutes les fibres nociceptives durant le développement qui diminuera de moitié après la naissance pour n'être exprimé que dans 30 à 40% des nocicepteurs à l'âge adulte et majoritairement dans les fibres peptidergiques (CGRP⁺) et quelques fibres A (NF200⁺) (Denk, Bennett and McMahon, 2017). TrkA est aussi exprimé au niveau du système nerveux sympathique (fibres TH⁺) durant le développement et à l'âge adulte (Denk, Bennett and McMahon, 2017). A l'âge adulte, outre dans les fibres sensorielles, le récepteur TrkA est exprimé au niveau de cellules non-neuronales comme les cellules du système immunitaire (*e.g.* mastocytes pulmonaires) ou les cellules structurales (*e.g.* fibroblastes).

b. Internalisation et transport du complexe NGF-TrkA

La forme mature du NGF se lie au niveau de son site de liaison sur la partie extracellulaire du récepteur TrkA. La présence du ligand va entrainer l'homodimérisation de deux récepteurs TrkA (**Figure 39 – I**^{ère} possibilité) formant un complexe NGF/TrkA qui sera, tout d'abord, internalisé dans un endosome par différentes voies : (1) de la clathrine, (2) des cavéoles ou (3) par macropinocytose (Zweifel, Kuruvilla and Ginty, 2005). Une fois internalisé, le complexe est transporté dans l'endosome, à une vitesse comprise entre 2 à 20 mm/heure, de la terminaison périphérique au niveau du corps cellulaire des neurones dans le ganglion de la racine dorsale (DRG) (Miller and Kaplan, 2001; Delcroix *et al.*, 2003). Le complexe NGF/TrkA pourra donc agir d'une part en périphérie au niveau des terminaisons nerveuses puis après son transport rétrograde au niveau du DRG (voir **Figure 43** récapitulative – page 90). Dans le DRG, le complexe NGF/TrkA va moduler la transcription de différents neurotransmetteurs, récepteurs ou canaux ioniques. En contexte inflammatoire, par exemple, comme dans une PR établie, le complexe NGF/TrkA pourra participer à augmenter la transcription de la substance P, du BDNF, des canaux TRPV1, ASIC3 ou du récepteur TrkA lui-même (Mantyh *et al.*, 2011). Puis en retour, certains de ces médiateurs pourront être transportés par voie antérograde du DRG vers la périphérie.

c. Voies de signalisation activées

Outre ce phénomène d'internalisation important dans la signalisation plutôt à moyen ou long terme du NGF, sa liaison aux récepteurs TrkA entraine aussi l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires.

La voie canonique activée par TrkA est celle des *Mitogen Activated Protein* kinases ou MAPKs. Cette voie fait intervenir une cascade de phosphorylation complexe à partir de différents médiateurs. La première étape est la reconnaissance des tyrosines phosphorylées au niveau de TrkA par des molécules effectrices possédant un domaine SH2 (*i.e.* domaine d'homologie 2 à src) reconnaissant spécifiquement les tyrosines phosphorylées au niveau de la partie intracellulaire de TrkA. Ces molécules effectrices sont la protéine adaptatrice Shc ou *Src homology-2 containing protein*, la phospholipase C γ (PLC γ) et la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) qui interagissent respectivement avec les résidus phosphorylés Tyr490, Tyr785 et Tyr751 (Obermeier *et al.*, 1993; Kaplan and Miller, 2000; Chao, 2003). Les principales voies et intervenants sont présentés dans la **Figure 40**.

► La voie Ras/Raf

La liaison de Shc à TrkA conduit à sa phosphorylation lui donnant la capacité de recruter la protéine *Growth factor receptor bound protein-2* (Grb2) qui interagit avec le facteur *Son of sevenless* (Sos), un facteur d'échange pour la protéine G, Ras (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992; Segal and Greenberg, 1996). Ras active alors la kinase de Raf qui active Raf par phosphorylation. Une fois activée, Raf phosphoryle d'autres kinases dont MEK 1/2 : la kinase de la MAPK ERK1/2 qui stimulera ERK1/2 par phosphorylation. ERK1/2 va activer et induire la translocation dans le noyau de facteurs de transcription (*e.g.* Elk-1, CREB). Par exemple, parmi ces facteurs de transcription, CREB ou *Cyclic adesonine monophosphate Response Element-Binding protein*, activé par phosphorylation, pourra recruter des coactivateurs transcriptionnels (*e.g.* CBP pour *CRE-binding protein*, p300) et faciliter la transcription de gènes particulièrement impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. La MAPK ERK5 est aussi activable par cette voie Ras/Raf *via* l'activation de MEK5 et est aussi impliquée dans la survie cellulaire (Watson *et al.*, 2001). Cette description reste schématique car des interactions avec d'autres voies de signalisation sont possibles.

► <u>La voie PLCy/PKC</u>

La PLCγ interagit avec le récepteur TrkA, où elle sera activée et va cliver le phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate en deux messagers secondaires que sont le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃). Le DAG va activer les protéines kinases C (PKC) par un processus dépendant du calcium qui sera libéré dans le cytoplasme suite à la liaison de l'IP₃ au niveau du réticulum endoplasmique. Enfin, cette voie activera les MAPK p38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) impliquées respectivement dans la survie cellulaire et l'apoptose.

► La voie PI3K/Akt

La phosphorylation du récepteur TrkA au niveau du résidu tyrosine en position 751 permet l'interaction du récepteur avec la PI3K qui pourra ensuite former du phosphatidyl inositol 3,4biphosphonate qui va recruter à la membrane la kinase d'Akt et l'activera. Akt joue un rôle important dans la survie cellulaire.


Figure 40 : Voies de signalisation intracellulaire principalement activées par NGF/TrkA

Le complexe NGF/TrkA est capable d'activer 3 grandes voies de signalisation présentées ici.

Shc : Src homology-2 containing protein, Grb2 : growth factor receptor bound protein-2, Sos : son of sevenless, RafK : Raf kinase, MEK : MAP ERK kinase, PI₃K : phosphatidyl inositol 3-kinase, PLCγ : phospholipase C gamma, PKC : protéine kinase C, MKK : MAP-kinase kinase, JNK : c-Jun-N-terminal kinase

2.2.2 *Le récepteur p75*^{NTR}

a. Structure et expression du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est codé par le gène *P75NTR* présent chez l'Homme au niveau du chromosome 17, il fait environ 23 kb et comporte 6 exons. Le récepteur p75^{NTR} est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR) et est constitué (1) d'une partie extracellulaire composée de 4 domaines riches en cystéines caractéristiques des TNFR, (2) d'une courte partie transmembranaire et (3) d'une partie intracellulaire qui ne porte pas d'activité catalytique intrinsèque mais qui possède deux domaines permettant l'interaction avec des protéines adaptatrices et l'induction d'une signalisation cellulaire. Ces domaines sont le domaine juxta membranaire (CD) ou *Chopper domain* et le domaine de mort (DD) ou *Death domain* (**Figure 37**) (Kraemer, Yoon and Carter, 2014; Vilar, 2017).

A l'âge adulte, le récepteur p75^{NTR} est exprimé dans certaines structures du SNC (*e.g.* neurones magnocellulaires du cerveau antérieur basal, neurones du putamen, neurones moteurs, cellules de Purkinje) et dans le SNP, où il est exprimé dans les neurones sensoriels et sympathiques et dans une proportion faible des fibres parasympathiques et entériques. Le récepteur p75^{NTR} est aussi exprimé

dans d'autres types cellulaires comme les cellules photoréceptrices, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann, les cellules mésenchymateuses de différents organes (*e.g.* reins, dents, poumons, muscles, membres...), etc. (Roux and Barker, 2002).

b. Voies de signalisation activées par p75^{NTR}

Comme le récepteur p75^{NTR} a été initialement découvert en tant que récepteur de faible poids moléculaire au NGF (Chao *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987) et comme il ne possède pas de domaine catalytique intrinsèque, il a pendant longtemps été considéré comme un partenaire du récepteur TrkA (Chao and Hempstead, 1995). En réalité, ce récepteur peut induire des phénomènes de signalisations cellulaires qui lui sont propres selon le type de neurotrophine à laquelle il est associé (*i.e.* pro-NT ou NT mature) et la combinaison des récepteurs entre eux (Chen *et al.*, 2008). Parmi les combinaisons de récepteurs, p75^{NTR} peut s'associer avec le récepteur TrkA mais aussi à la Sortiline qui est un corécepteur de la famille des protéines *Vacuolar carboxy-peptidase sorting receptor-10* ou VSP10 donnant au final 3 différents complexes possibles p75^{NTR}/TrkA/NGF, p75^{NTR}/Sortiline/NGF et p75^{NTR}/Sortiline/Pro-NGF (**Figure 39**) (Nykjaer *et al.*, 2004; Lewin and Nykjaer, 2014; Denk, Bennett and McMahon, 2017a). Notons que la formation du complexe p75^{NTR}/Sortiline/NGF est la moins probable, car la Sortiline possède une affinité modérée pour la forme mature du NGF (Nykjaer *et al.*, 2004). De plus, le domaine juxta-membranaire (CD) peut, à lui seul, induire une signalisation cellulaire (Coulson *et al.*, 2004).

Le récepteur p75^{NTR} activera principalement deux voies de signalisation : la voie de la MAPK JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) induisant l'apoptose *via* la forme pro-protéique du NGF et la voie du NF^KB induisant la survie cellulaire *via* la forme mature du NGF (**Figure 41**).

► La voie MAPK JNK

L'activation de cette voie par le récepteur p75^{NTR} peut se faire par plusieurs mécanismes : (1) par le recrutement de protéines adaptatrices (*e.g TNF receptor associated factor 6* [Traf6], *neurotrophin receptor-interacting factor* [NRIF] ou *melanoma-associated antigen* [MAGE]), (2) par la synthèse de céramide ou (3) par l'activation de la protéine G Rac1. Cette voie conduit notamment à l'activation des caspases ou *cysteinyl-aspartate-cleaving proteases* (*i.e.* protéases à cystéines). D'autre part, la voie MAPK JNK peut conduire à l'activation de différentes voies apoptotiques comme c-jun, ATF2 et p53.

La voie NFκB

L'activation de cette voie par le récepteur p75^{NTR} peut se faire par plusieurs mécanismes : (**1**) par le recrutement de protéines adaptatrices, TRAF6 ou RIP-2, (**2**) par l'activation de la voie PI3K. Une fois activé, NFkB peut soit stimuler la transcription de molécules à activité anti-apoptotique (*e.g.* cIAP-1, Bclc-2), soit induire la synthèse de bloqueurs de la voie JNK induisant l'apoptose.



Figure 41 : Les principales voies activées par le récepteur p75NTR

N'est pas représenté ici, les associations de récepteurs et co-récepteurs entre eux mais schématiquement les deux voies de signalisation principales activées par le récepteur p75^{NTR} avec, d'une part, la voie JNK permettant d'induire un mécanisme d'apoptose et, d'autre part, la voie NFkB induisant la survie cellulaire.

TRAF : TNF receptor associated factor, **MAGE** : melanoma-associated antigen, **NRIF** : neurotrophin receptor-interacting factor, **ATF** : activating transcription factor, **RIP** : receptor interacting-protein

c. Caractéristiques des différents complexes

Pour le complexe p75NTR/Sortiline : la co-expression de la sortiline et de p75NTR est indispensable à l'induction de l'apoptose par le pro-NGF (Nykjaer *et al.*, 2004). De plus, la sortiline joue un rôle de commutateur moléculaire car en son absence, le clivage du pro-NGF en sa forme mature est facilité (Nykjaer *et al.*, 2004).

Pour le complexe p75^{NTR}/**TrkA** : lorsque les récepteurs TrkA et p75^{NTR} sont co-exprimés, le récepteur p75^{NTR} augmente par 100 fois l'affinité du NGF pour TrkA (Reichardt, 2006; Vilar, 2017). En cas de faible concentration en NT, le récepteur p75^{NTR} pourrait donc agir comme un co-récepteur permettant de faciliter l'interaction des NT avec leur récepteur Trk de forte affinité (Barker, 2004). Il est intéressant de noter qu'au lieu d'activer des voies d'apoptose comme l'homodimère p75^{NTR}-p75^{NTR}, l'hétérodimère TrkA-p75^{NTR} conduit à la survie neuronale. Le mécanisme par lequel les récepteurs TrkA et p75^{NTR} interagissent reste mal connu et deux hypothèses sont avancées. L'une ne requiert pas une interaction directe entre les deux récepteurs et se base sur le transfert de ligand d'un récepteur à l'autre. Alors que l'autre hypothèse avance une association physique des récepteurs qui forment un hétérodimère (Toni, Dua and van der Graaf, 2014).

2.3. Les différentes fonctions du NGF

Le NGF est un facteur pléiotropique car il joue de nombreux rôles au sein de l'organisme qui sont distincts entre le stade développemental et l'âge adulte. Nous nous intéresserons bien sûr plus particulièrement à son rôle dans les mécanismes de la douleur dans une prochaine partie (voir CHAPITRE 3 : II.).

2.3.1 Durant le développement

Le NGF joue un rôle crucial dans le développement des systèmes nerveux périphérique et central (Levi-Montalcini, 1987). Au niveau périphérique, tout d'abord, le rôle du NGF dans la survie des fibres nerveuses sympathiques a été mis en évidence dès sa purification par Stanley Cohen (1960). Après l'injection d'un bloqueur du NGF chez des rongeurs nouveau-nés, il avait pu observer une forte diminution de la densité des fibres nerveuses sympathiques périphériques mettant en avant le rôle du NGF dans la survie neuronale (Cohen, 1960). Outre la survie, le NGF est indispensable à la différenciation complète des fibres nerveuses sensorielles périphériques (Patel et al., 2000). Par exemple au niveau de la peau, l'administration d'un anti-NGF chez des ratons dans les 5 premières semaines de vie entraine une diminution de la densité des fibres cutanées nociceptives de type A δ alors que celle des afférences mécano-sensibles augmente (Ritter et al., 1991). Ces résultats ne sont pas retrouvés chez des rats adultes montrant l'importance du NGF durant le développement dans l'acquisition phénotypique des nocicepteurs (Ritter et al., 1991). En outre, au stade embryonnaire, presque la totalité des fibres afférentes nociceptives exprime TrkA et nécessite la présence du NGF pour leur survie confirmant son rôle crucial durant le développement notamment des fibres nociceptives (Figure 42) (Denk, Bennett and McMahon, 2017a). Dans les deux premières semaines post-natales, chez le rat et la souris, environ 50% des neurones vont perdre l'expression de TrkA et par conséquent leur dépendance au NGF (Ruit et al., 1990, 1992).



Figure 42 : Distribution des sous-types neuronaux et expression des récepteurs neurotrophiques durant le développement et à l'âge adulte chez le rat et la souris

Au stade embryonnaire 14 (E14), la majorité des neurones sensoriels au niveau des DRGs vont exprimer le récepteur au NGF : TrkA dont 100% des nocicepteurs mettant en avant un rôle indispensable du NGF dans le développement de ces neurones. Chez le juvénile, ici 21 jours après la naissance, tout comme à l'âge adulte, le ratio est modifié et il ne reste plus que 40% des neurones sensoriels qui expriment TrkA (adaptée de **Denk, Bennett & McMahon, 2017**).

Au niveau du système nerveux central, le NGF participe au développement et au maintien du phénotype cholinergique des neurones, au développement du système visuel et régule la réponse au stress en modulant l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Berry, Bindocci and Alleva, 2012; Roberti *et al.*, 2014; Bracci-Laudiero and De Stefano, 2015).

Les stratégies génétiques ont pu confirmer, en partie, le rôle du NGF et de TrkA au niveau développemental. Les souris $TrkA^{-/}$, développées pour la première fois en 1994, présentent une sévère neuropathie sympathique et sensorielle et meurent dans le premier mois de vie (Smeyne et al., 1994). La même année, Crowley et al. ont publié un modèle de souris knockout pour le NGF qui présentent aussi de graves problèmes de développement et meurent dans les trois premières semaines de vie (Crowley et al., 1994). Ces souris Ngf/- présentent un ptosis (i.e. terme médical décrivant la paupière qui tombe sur l'œil), une réduction de la taille des ganglions de la racine dorsale associée à une diminution des neurones sympathiques et sensoriels non compensée par la présence des autres neurotrophines (Crowley et al., 1994). Diminuer la signalisation NGF/TrkA en utilisant des souris avec un knockout conditionnel pour TrkA comme les souris TrkA^{F592A}, a permis de montrer l'importance du NGF dans le fonctionnement normal des centres d'ossification primaire et secondaire au moment du développement, par exemple (Tomlinson et al., 2016). Chez les souris p75NTR-/-, on observe une forte diminution de l'expression de CGRP et de la substance P au niveau des fibres nerveuses sensorielles périphériques associée à une perte neuronale au niveau des DRGs et une diminution importante de la densité d'innervation au niveau de l'épiderme (Lee et al., 1992; von Schack et al., 2001). Durant le développement, le récepteur p75^{NTR} joue lui aussi un rôle important dans la régulation de l'apoptose développementale et notamment dans le cerveau antérieur basal, le ganglion trigéminal, la rétine ou encore la moelle épinière (Meeker and Williams, 2015).

2.3.2 A l'âge adulte

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk est variable en fonction du stade de développement. Dès la naissance, le nombre de neurones sensoriels nociceptifs exprimant TrkA va diminuer de plus de 50% et le NGF ne sera plus indispensable pour la survie neuronale à l'âge adulte (**Figure 42**) (Lindsay, 1988; Denk, Bennett and McMahon, 2017). Les neurones vont exprimer Ret, le récepteur au facteur neurotrophique dérivées des cellules gliales ou GDNF. De plus, comme les souris TrkA-/- et Ngf/- ne survivent pas plus d'un mois, il a été difficile d'utiliser des stratégies de *knockout* total pour étudier l'impact d'une absence de la signalisation du NGF à l'âge adulte.

Néanmoins, il a été largement démontré que le NGF joue un rôle essentiel à l'âge adulte dans l'homéostasie et la plasticité neuronale, la néoinnervation après une lésion ou un dommage tissulaire, dans l'inflammation et la réponse immunitaire en condition pathologique (Nicol and Vasko, 2007). Dans les neurones sympathiques, le NGF va réguler la production de noradrénaline *via* l'induction de la tyrosine hydroxylase (TH). Dans le SNC, le NGF est produit en forte quantité dans le cortex, l'hippocampe et l'hypophyse et dans une plus moindre mesure dans d'autres structures cérébrales comme le thalamus, le ganglion de la base, la moelle épinière ou la rétine (Aloe *et al.*, 2012). Au niveau de l'hippocampe par exemple, bloquer le NGF endogène diminue significativement la potentialisation à long terme (LTP) et perturbe la mémoire spatiale (Conner *et al.*, 2009).

Comme nous avons pu le voir dans cette partie, le NGF joue un rôle crucial dans le développement, la différentiation, la survie et l'acquisition phénotypique des fibres sensorielles nociceptives démontrant un lien étroit entre NGF et douleur. Cette notion fera l'objet de la prochaine partie de cette thèse et apportera des éléments clés pour nos études.

II. NGF et douleur

Le NGF joue un rôle déterminant dans la douleur. Les données expérimentales et génétiques sont nombreuses avec des preuves de son implication dans les mécanismes nociceptifs à la fois *in vitro* et *in vivo*, chez l'animal et chez l'Homme.

In vitro, par exemple, l'application de NGF sur des cultures primaires de neurones de DRGs entraine, *via* l'activation du récepteur TrkA, la sensibilisation rapide de ces neurones à des stimuli thermique, mécanique et chimique (Denk, Bennett and McMahon, 2017). *In vivo*, l'injection systémique (Lewin, Ritter and Mendell, 1993) ou locale (Andreev NYu *et al.*, 1995) de NGF induit une profonde hyperalgie thermique et mécanique chez les rongeurs ou le cochon. Chez l'Homme, et plus précisément chez le sujet sain, l'injection intradermique (Dyck *et al.*, 1997; Rukwied, Mayer, *et al.*, 2010; Andresen *et al.*, 2016), intramusculaire (Svensson *et al.*, 2003) ou systémique (Petty *et al.*, 1994) de NGF induit une allodynie et une hyperalgie locale. Enfin, les taux de NGF sont élevés dans de nombreuses conditions pathologiques associées à une douleur chronique : la cystite interstitielle, la prostatite, l'arthrite, l'arthrose, la pancréatite, la migraine, la douleur cancéreuse, la neuropathie diabétique, la douleur non-cancéreuse et la douleur post-opératoire (Chang *et al.*, 2016).

Outre ces évidences, l'association entre NGF et douleur a été mis en exergue par des observations cliniques d'au moins deux formes d'insensibilité congénitale à la douleur (ICD). Ce syndrome clinique heureusement très rare est caractérisé par une absence ou une diminution très importante de la perception douloureuse. L'ICD fait partie des polyneuropathies héréditaires (HSAN pour Hereditary Sensory Autonomic Neuropathy). D'un point de vue génétique, deux formes d'HSAN sont directement associées à des mutations des gènes de la voie NGF/TrkA. La première est l'insensibilité congénitale à la douleur avec anhydrose (i.e. absence ou diminution anormale de la sudation) ou HSAN de type IV. C'est une pathologie autosomique récessive caractérisée par une altération diffuse, sélective et profonde de la sensibilité douloureuse et thermique à laquelle s'ajoutent un comportement d'automutilation et un retard mental. Cette pathologie est associée à des mutations au sein du gène NTRK1 comme la délétion d'une base dans l'exon C (1726delC) (Indo et al., 1996). La deuxième correspond à l'HSAN de type V et se caractérise par une altération de la sensibilité douloureuse au niveau des tissus profonds (notamment osseux) et une atteinte des fibres nerveuses amyéliniques principalement, sans anhydrose ou retard mental. Cette forme est autosomique récessive et est notamment associée à des mutations du gène β -NGF (Einarsdottir *et al.*, 2004; Danziger, 2009). On peut retrouver par exemple comme mutation, la transition perte de fonction : 661C<T (R211W) (Einarsdottir et al., 2004; Minde et al., 2004), la transition : 661C>T (R100W) (Capsoni et al., 2011) ou la transversion homozygote 680C<A associée à la délétion de 2 paires de base dans l'exon 1 (681gelGG) du gène β -NGF (Carvalho et al., 2011).



Figure 43 : NGF et douleur : les mécanismes périphériques et centraux

Dans le cas d'une inflammation articulaire, les fibres afférentes primaires nociceptives qui expriment TrkA vont être activées et/ou sensibilisées par le NGF. (1) Au niveau périphérique, la liaison du NGF va activer différentes voies de signalisation intracellulaires capables de moduler l'expression (1 augmente ou \downarrow diminue) et la présentation à la membrane de différents récepteurs, tels que les récepteurs à la bradykinine, des canaux calciques, sodiques ou potassiques, les canaux TRPVI ou ASIC3 ou encore d'autres mécanotransducteurs putatifs. (2) Le complexe NGF/TrkA est internalisé et par transport rétrograde est amené jusqu'au corps cellulaire des neurones nociceptifs présents dans les ganglions rachidiens de la racine dorsale (DRG) où il va augmenter la transcription de différents récepteurs ou neurotransmetteurs, eux-mêmes transportés par un transport antérograde soit vers la périphérie soit vers les terminaisons centrales. (3) Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, l'augmentation de la libération de la substance P, de CGRP, du BDNF et celle du glutamate au niveau des terminaisons nerveuses centrales des fibres afférentes primaires TrkA⁺ puis leurs fixations à leur récepteur spécifique : NK-I pour la substance P, CGRP-R pour le CGRP, TrkB pour le BDNF va conduire à une dépolarisation importante du neurone de projection de second ordre augmentant par exemple l'expression de c-fos et conduisant, au final, à la lever de l'inhibition au magnésium des récepteurs NMDA au glutamate (adaptée de **Mantyh et al., 2011**).

SP : substance P, **BDNF** : brain-derived neurotrophic factor, **TRPVI** : transient receptor potential vanilloid 1, **ASIC** : acid-sensing ionic channel, **CGRP** : calcitonin-gene related peptide, **BR**₂ : récepteur à la bradykinine 2, **Trk** : récepteur à activité tyrosine kinase, **NMDA** : récepteur *N*-méthyl-D-aspartate, **AMPA** : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique

Depuis de nombreuses années, le rôle prépondérant du NGF dans la douleur et particulièrement dans l'hyperalgie thermique et mécanique a été démontré. Pourtant et de manière intéressante, les mécanismes sous-tendant l'hyperalgie thermique induite par le NGF semblent être distincts de ceux impliqués dans la mise en place de l'hyperalgie mécanique et restent encore mal compris surtout pour l'hyperalgie mécanique (Lewin, Ritter and Mendell, 1993; Lewin, Rueff and Mendell, 1994). En effet, l'hyperalgie thermique apparait dans les dix premières minutes suite à l'injection de NGF alors que l'hyperalgie mécanique se développe plus tardivement avec un délai initialement décrits de quelques heures. Cette différence temporelle semble refléter (1) l'induction de changements extrêmement rapides dans les terminaisons périphériques des fibres C qui les sensibilisent aux stimuli thermiques nocifs et (2) des changements à plus long terme affectant l'expression de nombreux gènes qui conduiront à une sensibilisation centrale et participeront au développement de l'hyperalgie mécanique et au maintien du statut hyperalgique (Lewin, Ritter and Mendell, 1993; Lewin, Rueff and Mendell, 1994). Cette dichotomie a depuis évolué car au sein de l'hyperalgie mécanique, il semble aussi exister des mécanismes précoces permettant le développement d'une hypersensibilité dès 10 à 30 minutes après l'injection de NGF qui seront développés plus en détails dans la partie ci-rapportant (voir CHAPITRE 3 : II. 2) (Lewin, Lechner and Smith, 2014; Kays et al., 2018).

Outre le délai d'initiation entre l'hypersensibilité thermique et mécanique, il existe un délai de restauration. En effet, l'hyperalgie mécanique perdure dans le temps et met plus de temps à être rétablie par l'organisme à un niveau physiologique en comparaison de l'hyperalgie thermique, appuyant ainsi l'hypothèse de mécanismes distincts entre ces deux types d'hypersensibilité (Rukwied, Schley, *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 2013).

La **Figure 43** permet de récapituler les principaux mécanismes associant le NGF à la douleur. Nous nous intéresserons de manière plus précise aux mécanismes mis en jeu, tout d'abord, dans le développement de l'hyperalgie thermique, qui fait aujourd'hui l'objet d'un certain consensus, puis ceux impliqués dans la mise en place de l'hyperalgie mécanique qui restent sujet à controverse (pour plus de détails voir Pezet and McMahon, 2006; Lewin, Lechner and Smith, 2014; Pezet *et al.*, 2014; Mizumura and Murase, 2015a; Denk, Bennett and McMahon, 2017).

1. Hyperalgie thermique et NGF

En ce qui concerne l'hyperalgie au chaud induite par le NGF, il apparait clair que le canal ionique TRPV1 soit un élément clef dans sa mise en place. En effet, *in vitro*, le NGF est capable d'augmenter l'amplitude du courant TRPV1 (Shu and Mendell, 1999). Il est aussi capable, outre la stimulation de l'activité des canaux TRPV1 déjà existants, d'augmenter l'expression de ces canaux au niveau des neurones des DRGs (Huang, Zhang and McNaughton, 2006). De plus, les souris *knockout* pour le gène *Trpv1* (*Trpv1-/-*) perdent en partie leur capacité à développer une hyperalgie thermique au chaud suite à l'injection de NGF (Chuang *et al.*, 2001). Ce mécanisme semble nécessiter, en premier lieu, l'activation du récepteur TrkA plutôt que le récepteur p75^{NTR} puisque l'hyperalgie thermique induite par l'injection de NGF persiste chez les souris *p*75^{NTR}/- (Bergmann *et al.*, 1998). Enfin, il a été mis en évidence, chez le rat-taupe nu qu'une hypo-fonctionnalité du récepteur TrkA abolit spécifiquement leur capacité à développer une hyperalgie thermique au chaud via TRPV1 (Park *et al.*, 2008; Omerbašić *et al.*, 2016). Par contre, nous ne pouvons pas exclure un rôle modulateur indirect du récepteur p75^{NTR} qui semble entretenir l'hyperalgie une fois mise en place et jouerait donc un rôle plutôt dans la persistance de l'hypersensibilité thermique (Khodorova, Grant D Nicol and Strichartz, 2017).

A propos des voies de signalisation activées par le NGF *via* TrkA impliquées dans l'hyperalgie au chaud due à TRPV1, il persiste des incertitudes. Initialement, certaines études avaient pu mettre en évidence un rôle de la protéine kinase A (Shu and Mendell, 2001), de la protéine kinase Cγ (Chuang *et al.*, 2001) dans l'activation de TRPV1 puis ces résultats furent critiqués et d'autres études démontrèrent une fonction essentielle de la voie PI₃K tandis que la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase Ca²⁺/calmoduline dépendante de type 2 (CAMKII) seraient impliqués plus tardivement (Bonnington and McNaughton, 2003; Stein *et al.*, 2006). La voie Ras-MAPK pourrait elle aussi participer à augmenter l'expression de TRPV1 en activant la MAPK p38, qui, dans les corps cellulaires de neurones nociceptifs, augmenterait la traduction puis le transport antérograde du canal TRPV1 au niveau périphérique (Ji *et al.*, 2002; Bron *et al.*, 2003).

Le développement de l'hyperalgie thermique, notamment aiguë, pourrait également faire intervenir d'autres canaux partenaires sensibles au chaud particulièrement TRPM3 et TRPA1, au moins en condition physiologique (Vandewauw *et al.*, 2018). Malheureusement, le rôle de ces canaux dans l'hyperalgie thermique n'a pas encore été clairement prouvé dans un contexte de douleur chronique et leur régulation par les voies NGF/TrkA reste encore inconnue.

Malgré un rôle prépondérant, le canal TRPV1 n'est pas le seul facteur impliqué, puisque l'hyperalgie thermique semble être aussi médiée par une forme atypique de la PKC : PKM ζ qui participerait principalement au maintien de l'hyperalgie thermique plutôt qu'à son initiation en aval du récepteur p75^{NTR} (Khodorova, Grant D. Nicol and Strichartz, 2017). Par ailleurs, les souris *knockout* pour le canal sodique Na_v1.8 ne développent pas d'hyperalgie thermique suite à l'administration de NGF laissant supposer qu'il peut aussi interagir avec ce canal dans le développement de ce type hypersensibilité (Kerr *et al.*, 2001). Enfin, une sympathectomie partielle est capable de réduire l'hyperalgie thermique induite par le NGF laissant supposé un rôle des fibres nerveuses sympathiques (Andreev NYu *et al.*, 1995).

2. Hypersensibilité mécanique et NGF

Les mécanismes sous-tendant l'hypersensibilité mécanique, que ce soit une hyperalgie ou une allodynie, induite par le NGF sont encore sujets à controverse.

Tout d'abord, il est très intéressant de constater qu'une courte augmentation de la concentration de NGF est capable d'induire une hypersensibilité mécanique perdurant jusqu'à plusieurs semaines contrairement à l'hypersensibilité thermique (Lewin, Ritter and Mendell, 1993; Petty et al., 1994). En effet, chez l'Homme, l'injection systémique (s.c. ou i.v.) de NGF humain recombinant (NGF_{hr}), même à faible dose $(0,1 \ \mu g/kg)$, entraine des effets à la fois locale et systémique avec le développement d'une hyperalgie mécanique primaire localisée au site d'injection persistant jusqu'à 7 semaines associée à une myalgie diffuse (Petty et al., 1994). L'injection intradermique locale de NGFhr (1µg) induit, elle aussi, une hypersensibilité mécanique restreinte au site d'injection qui débute dans les 3 premiers jours suivants l'injection, atteint son pic au bout de 21 jours et perdure jusqu'à 7 semaines alors que l'hyperalgie thermique est déjà largement rétablie (Rukwied, Mayer, et al., 2010). Par ailleurs, l'administration intramusculaire aiguë (Svensson et al., 2003; Andersen et al., 2008) ou répétée (Hayashi et al., 2013) de NGFhr conduit au développement d'une hypersensibilité mécanique, au départ localisée puis progressivement diffuse. Ces observations mettent en avant plusieurs caractéristiques de ce type d'hypersensibilité induite par le NGF : un critère de localisation de l'hypersensibilité en fonction du site d'injection (et donc d'hyperalgie primaire, secondaire ou diffuse) et un caractère de durée et de maintien d'un statut hyperalgique qui seraient la conséquence de mécanismes à la fois périphérique et central. A cela s'ajoute une notion d'hypersensibilité mécanique précoce versus tardive (Lewin, Lechner and Smith, 2014). En effet, malgré un délai souvent plus long dans le développement de l'hyperalgie mécanique par rapport à l'hyperalgie thermique, l'hyperalgie mécanique peut se développer après 10-30 minutes suite à une exposition au NGF. Ceci se traduit in vitro, par une augmentation significative rapide du nombre de potentiel d'action évoqués mécaniquement dans des neurones sensoriels isolés (Kays et al., 2018). Cette sensibilité plus précoce semble mettre en jeu des mécanismes périphériques et notamment des modulations traductionnelles et non transcriptionnelles (Kays et al., 2018).

La question des mécanismes mis en jeu dans l'hyperalgie mécanique et du rôle du NGF est débattue et est loin d'être élucidée, notamment car de nombreux mécanotransducteurs sont proposés. C'est pourquoi, nous développerons de manière non exhaustive quelques mécanismes pouvant être mis en jeu pour chacune des caractéristiques de cette hypersensibilité. Pour commencer, en adéquation avec la séquence temporelle initialement présentée et le délai plus long nécessaire au développement de l'hyperalgie mécanique par rapport à l'hyperalgie thermique, un mécanisme principalement central dans le développement de l'hypersensibilité mécanique avait été initialement proposé. Mécanisme par lequel le NGF, suite au transport rétrograde du complexe NGF/TrkA et à l'activation de voies de signalisation au niveau des corps cellulaires des fibres afférentes nociceptives, entraine (1) une modulation de l'expression transcriptionnelle de nombreux canaux et récepteurs impliqués dans la mécanotransduction et/ou dans l'excitabilité neuronale et (2) stimule l'expression de neurotransmetteurs tels que le CGRP, la substance P et le BDNF (Lewin, Rueff and Mendell, 1994).

Le NGF serait donc capable d'augmenter le nombre de transcrits puis la synthèse *de novo* de protéines impliquées dans la mécano-sensibilité tels que les canaux ioniques ASICs et TRPA1, par exemple, qui seront transportés en périphérie par un transport antérograde et, une fois exprimés à la membrane, participeront à augmenter la sensibilité mécanique périphérique. L'augmentation de l'expression de canaux sodiques impliqués dans l'excitabilité axonale tels que les canaux Na_v1.7 ou Na_v1.8 par le NGF pourraient aussi participer au développement de l'hyperalgie mécanique (Hirth *et al.*, 2013). Le rôle du canal Na_v1.8 dans l'hypersensibilité mécanique a été mis en évidence par la délétion conditionnée au niveau des neurones sensoriels et conduits à une insensibilité aux stimuli mécaniques douloureux (Abrahamsen *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les neurotransmetteurs dont l'expression est stimulée par le NGF : substance P, CGRP et BDNF, des souris mutées pour le gène tachykinine-1 codant la substance P ne présentent pas de déficit dans l'induction d'une hyperalgie mécanique (Cao et al., 1998). De plus, contrairement à ce que nous avions pu voir précédemment pour l'hyperalgie thermique, les rats taupe-nu conservent la capacité à développer l'hyperalgie mécanique suite à l'injection de CFA (Park et al., 2008). Or ces rats taupe-nu possèdent à la fois une perte d'expression de CGRP et de la substance P au niveau cutanée et un TrkA hypo-fonctionnel (i.e. défaut de phosphorylation), ce qui sous-tend d'une part que l'expression cutanée de CGRP et de la substance P n'est pas indispensable dans la mise en place de l'hypersensibilité mécanique et, d'autre part que la phosphorylation du récepteur TrkA et donc l'activation de certaines voies de signalisation, ne semble pas être l'élément le plus important dans la mise en place de l'hyperalgie mécanique. Par contre, au niveau spinal, l'administration intrathécale de CGRP induit une hypersensibilité mécanique. De plus, l'administration d'un antagoniste du CGRP entraine une diminution de l'hyperalgie mécanique dans un modèle inflammatoire (Sun, Lawand and Willis, 2003). Ainsi, le CGRP semble jouer un rôle important dans le développement et le maintien de l'hyperalgie mécanique en participant à la sensibilisation centrale spinale. Au CGRP, s'ajoute le BDNF comme élément clé dans la sensibilisation centrale induite par le NGF. En effet, comme nous l'avons développé précédemment (voir CHAPITRE 3 : I. 1.3.1), le BDNF

potentialise la transmission synaptique notamment *via* l'activation des récepteurs NMDA et l'augmentation de son expression est largement régulée par le NGF (Kerr *et al.*, 1999; Pezet *et al.*, 2002; Pezet and McMahon, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Lewin, Lechner and Smith, 2014).

Par contre, concernant les récepteurs aux NGF (*i.e.* TrkA ou p75^{NTR}) impliqués dans l'hypersensibilité mécanique, la question reste débattue. Certains auteurs ont montré que le récepteur p75^{NTR} jouerait un rôle primordial dans le développement de l'hyperalgie mécanique induite par le NGF injecté de manière locale, en entrainant la synthèse constante de la forme atypique de PKC : PKMζ, aussi impliquée dans le maintien de l'hyperalgie thermique (Khodorova, Nicol and Strichartz, 2013; Kays *et al.*, 2018). Pourtant, rappelons que l'hyperalgie mécanique induite par le NGF persiste chez les souris *p75^{NTR,/-}* (Bergmann *et al.*, 1998), ce qui n'exclut pas d'autres mécanismes que ceux induit *via* p75^{NTR}. De plus, d'autres études ont montré un rôle majeur de TrkA, plutôt que p75^{NTR}, dans le développement de l'hyperalgie mécanique avec, par exemple, l'utilisation d'un traitement anti-sens pour TrkA (par injection intrathécale) capable de réduire significativement l'expression de TrkA au niveau des fibres nociceptives des DRGs et de diminuer fortement l'hyperalgie mécanique induite par l'injection d'un anticorps dirigé contre le récepteur TrkA réduit l'hypersensibilité mécanique se développement de l'hypersensibilité mécanique se développement de l'hypersensibilité mécanique au niveau articulaire (Nencini *et al.*, 2017).

En outre, comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, le NGF est capable d'induire une néoinnervation de fibres nociceptives, cette « hyper-innervation nociceptive » participerait au développement et au maintien de l'hyperalgie notamment mécanique au niveau articulaire ou de la moelle osseuse (Ghilardi *et al.*, 2012; Jimenez-Andrade and Mantyh, 2012; Yasui *et al.*, 2012; Patrick W Mantyh, 2014; Denk, Bennett and McMahon, 2017a). Mais au niveau cutané, la sensibilisation des nocicepteurs cutanés par le NGF ne semble pas dépendre de la densité des fibres nerveuses intra-épidermes chez l'Homme ou le cochon (Hirth *et al.*, 2013).

Si l'on s'intéresse au développement d'une hypersensibilité mécanique localisée au site d'injection du NGF, cette hyperalgie primaire pourrait résulter de la combinaison entre une sensibilisation périphérique et une hyperexcitabilité axonale (Obreja *et al.*, 2017). Comme nous l'avions développé dans le chapitre sur les mécanismes à l'origine de la douleur, la sensibilisation périphérique peut résulter de différentes modalités. Parmi elles, des études électrophysiologiques ont montré un rôle du NGF dans la diminution du seuil d'activation des nocicepteurs mais aussi dans l'activation de nocicepteurs silencieux (Hirth *et al.*, 2013). Une étude récente a ainsi montré que l'hyperalgie mécanique pourrait dépendre de l'activation de nocicepteurs silencieux exprimant CHRNA3, la sous-unité neuronale α 3 du récepteur à l'acétylcholine, *via* la stimulation du canal ionique PIEZO2 par le NGF

(Prato, Francisco J Taberner, et al., 2017). En effet, le knockdown de Piezo2 par l'utilisation de petits ARN interférents (siARN) rend insensible les nocicepteurs silencieux CHRNA3⁺ sensibilisés par le NGF aux stimuli mécaniques malgré la présence de NGF (Prato, Francisco J Taberner, et al., 2017). De manière intéressante, ces nocicepteurs CHRNA3+ semblent être exprimés principalement au niveau viscéral, musculaire et articulaire (Prato, Francisco J Taberner, et al., 2017). Chez la souris, les nocicepteurs silencieux sont extrêmement rares au niveau cutané (<10% des fibres C nociceptives) et présentent des caractéristiques génétiques différentes des nocicepteurs silencieux innervant les viscères ou les tissus somatiques profonds (Prato, Francisco J Taberner, et al., 2017). Ainsi, il pourrait exister des mécanismes différents dans la mise en place de l'hyperalgie primaire au niveau de la peau et des tissus profonds. Mais comme les nocicepteurs silencieux sont bien plus présents au niveau cutané chez l'Homme et le singe que chez la souris, cette hypothèse doit encore être vérifiée. De manière intéressante, Obreja et son équipe ont montré que l'injection de NGF chez l'Homme au niveau du pied induit une perte de la ségrégation entre les fibres nociceptives mécano-insensibles et mécano-sensibles au niveau du site d'injection suggérant un changement phénotypique des nocicepteurs cutanés (Obreja et al., 2017). Ces mêmes auteurs proposent des changements de propriétés axonales des nocicepteurs au niveau de la zone injectée participant au développement et/ou au maintien de l'hypersensibilité (Obreja et al., 2017).

Contrairement au rôle clé du canal TRPV1 dans l'hyperalgie thermique, ce canal ne semble pas être directement associé au développement de l'hyperalgie mécanique car celle-ci n'est que peu atténuée lorsque le canal TRPV1 est bloqué ou chez les souris Trpv1+ (Huang, Zhang and McNaughton, 2006; Cavanaugh et al., 2009a). Eskander et al. ont montré que l'allodynie mécanique induite par le NGF pourrait mettre en jeu ce canal mais uniquement au niveau spinal (contrairement au développement de l'hyperalgie thermique) (Eskander et al., 2015). Nous avons rapidement introduit le canal mécanosensible PIEZO2 qui pourrait, une fois activé par le NGF, permettre le recrutement des nocicepteurs silencieux CHRNA3+ (Prato, Francisco J Taberner, et al., 2017). L'activité du canal PIEZO2 est modulée par la stomatin-like protein 3 ou STOML3 tout comme les canaux ASICs. Notons que chez des souris Stoml3-/, l'hyperalgie mécanique induite par l'injection systémique de NGF reste inchangée ce qui exclut un rôle direct de STOML3 (Wetzel et al., 2017). Par contre, la délétion de Stoml3 associée à celle d'Asic2 et d'Asic3 conduits à une perte drastique de la mécano-sensibilité des nocicepteurs notamment au niveau des fibres Aδ (Moshourab et al., 2013). Ainsi, l'interaction entre ASICs et STOML3 semble participer au développement de l'hypersensibilité mécanique. Or, le NGF est un modulateur transcriptionnel positif du canal ASIC3 (Mamet et al., 2002) mais ces canaux ASICs seuls ne sont pas directement impliqués dans la mécanotransduction mais plutôt dans la régulation de la mécano-sensibilité (Omerbašić et al., 2015). Un autre canal a été proposé comme candidat dans la mise en place de l'hyperalgie mécanique induite par le NGF : le canal TRPA1 mais son rôle reste controversé. Tout d'abord, la mécano-sensibilité des neurones des DRGs ne requièrent pas TRPA1 (Brierley et al., 2011). Néanmoins, l'expression de ce canal est augmentée en condition inflammatoire et l'utilisation

d'antagonistes de ce canal (*e.g.* AP-18 ou HC-030031) injectés par voie intra-plantaire, intrapéritonéale, intrathécale ou orale réduit significativement l'hyperalgie mécanique dans des modèles inflammatoires tels que le modèle au CFA ou le modèle carragénine (Petrus *et al.*, 2007; Eid *et al.*, 2008; da Costa *et al.*, 2010). Une étude récente chez des souris *Trpa1*-/- suggère un rôle de TRPA1 dans l'arthrite chronique et notamment dans l'hypersensibilité mécanique mais exclut son rôle dans la douleur aiguë (Horváth *et al.*, 2016).

Concernant les voies de signalisation activées par le NGF et impliquées dans l'hypersensibilité mécanique, elles restent très largement méconnues. Ostubo *et al.*, (2012) ont pu mettre en évidence un rôle clef de ERK2 (mais pas de ERK1) dans la mise en place de l'hypersensibilité spécifiquement mécanique en utilisant des souris *knockout* conditionnel pour le gène *Erk2* au niveau du système nerveux central (Otsubo *et al.*, 2012). De plus, la voie de la protéine kinase C (PKC) semble être activée quelques heures après la stimulation par le NGF et son activité serait amplifiée par l'insertion de canaux ioniques au niveau membranaire (Di Castro *et al.*, 2006).

III. Potentiels thérapeutiques et effets secondaires associés au blocage du NGF

Nous avons pu voir que nombre d'études ont mis en évidence un rôle crucial du NGF dans les mécanismes nociceptifs. De manière logique, des stratégies visant à inhiber le NGF ou ses récepteurs ont vu le jour afin d'évaluer le potentiel thérapeutique du blocage du NGF. Ces stratégies pharmacologiques utilisent soit des anticorps, des peptoïdes ou des petits domaines membranaires permettant principalement soit (1) la séquestration du NGF libre, soit (2) prévenir l'interaction du NGF avec son récepteur spécifique TrkA, soit (3) inhiber les fonctions de TrkA (Chang *et al.*, 2016).

1. Etudes précliniques

Les études précliniques ont rapidement montré un intérêt majeur de l'utilisation des anti-NGF pour diminuer la douleur. L'administration systémique d'anticorps anti-NGF entraine une réduction importante de l'hypersensibilité mécanique et thermique dans des modèles de douleurs dont la douleur inflammatoire (Lewin, Rueff and Mendell, 1994; Woolf *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 2005), la douleur viscérale où l'utilisation d'un anti-NGF a montré aussi une efficacité antalgique dans la cystite (Guerios *et al.*, 2008) ou encore dans la douleur osseuse cancéreuse ou non (Halvorson *et al.*, 2005; Jimenez-Andrade *et al.*, 2011; Mantyh *et al.*, 2011; McCaffrey *et al.*, 2014; Majuta *et al.*, 2015). Pour la douleur somatique profonde articulaire, les anti-NGF ont montré une efficacité antalgique dans plusieurs modèles d'arthrose chez les rongeurs : le modèle par injection de monoiodoacétate (MIA), les modèles de déchirure (MMT) ou de déstabilisation (DMM) du ménisque médial du genou (Miller, Block and Malfait, 2017) et chez les félins : le modèle de dégénérescence articulaire chez le chat (anticorps monoclonal anti-NGF félinisé) (Gruen *et al.*, 2016). Chez l'animal, l'anti-TrkA murin MNAC13 exhibe une efficacité analgésique dans la douleur inflammatoire suite à l'injection de formaline ou dans la douleur neuropathique chez un modèle de ligature du nerf sciatique. Mais à l'heure actuelle, cet anticorps n'a pu être humanisé et n'a donc pas été utilisé en clinique (Ugolini *et al.*, 2007).

2. Etudes cliniques

Les études cliniques, quant à elles, ont vu le jour dès 2005 avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le NGF, le tanézumab (*i.e.* aussi appelé RN624, cet anticorps correspond à l'anti-NGF murin muMab911 humanisé) (Lane, Webster and Shiao-Ping, 2005). Cet anticorps monoclonal IgG2 humanisé bloque l'interaction du NGF avec ses récepteurs : TrkA et p75^{NTR}. Son efficacité a été testée dans différentes pathologies douloureuses dont l'arthrose (Lane, Webster and Shiao-Ping, 2005; Lane *et al.*, 2010), le mal du bas du dos (Katz *et al.*, 2011), la cystite (Evans *et al.*, 2011) ou la douleur cancéreuse (Sopata *et al.*, 2015).

L'étude clinique de phase II du tanézumab de Lane et collègues, de 2010, avait eu un retentissement important dans la communauté scientifique donnant aux patients arthrosiques (arthrose du genou) une réelle possibilité de prise en charge de la douleur avec une diminution dose-dépendante de la douleur ressentie jusqu'à 50% et une efficacité à long terme : plus de 8 semaines d'efficacité pour une seule injection (**Figure 44**) (Lane *et al.*, 2010).



Figure 44 : Evaluation de la douleur chez des patients arthrosiques suite à un traitement par un anti-NGF : le tanézumab

Etude clinique de phase II chez des patients arthrosiques évaluant la douleur suite à deux injections intraveineuses d'un anti-NGF : le tanézumab aux doses de 10, 25, 50, 100 et 200 μ g/kg à la semaine 0 puis la semaine 8. Les patients étaient âgés de 40 à 75 ans et randomisés dans chacun des groupes (n = 76 / groupe) (d'après **Lane, 2010**).

Le tanézumab (Pfizer et Eli Lilly) n'est pas le seul anti-NGF en clinique, en effet, le fasinumab développé par Regeneron et Teva et le fulranumab développé par Janssen et Amgen font partis des anti-NGF testés à l'heure actuelle.

L'utilisation des thérapies anti-NGF semble présenter des avantages indéniables en matière d'efficacité antalgique dans des pathologies à la fois viscérale (*e.g.* cystite) et somatique (*e.g.* arthrose). Mais à la suite des premiers essais cliniques, malgré des effets remarquables concernant la diminution des symptômes douloureux, certains effets indésirables ont conduit l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA ou *Food and Drug Administration*) à demander l'arrêt des essais cliniques. La première demande en 2010 a été levée en 2012 mais la même année, une deuxième demande de la FDA fut faite entrainant l'arrêt des essais cliniques jusqu'en 2015, année à laquelle ils reprirent.

Se développant dans 5 à 10% des cas, les effets indésirables principalement retrouvés suite aux thérapies anti-NGF sont le développement d'un œdème périphérique, des désordres neurosensoriels périphériques (*e.g.* paresthésie, hypoesthésie), le développement d'une arthralgie, une activité ostéonécrotique et l'accélération des arthropathies destructives (Chang *et al.*, 2016; Bannister, Kucharczyk and Dickenson, 2017; Bannwarth and Kostine, 2017). Certains auteurs affirment que les anti-NGF n'induisent pas d'ostéonécrose en tant que telle mais juste l'accélération de la progression de l'arthrose due à une augmentation de l'activité des patients. De plus, les effets indésirables développés dépendent à la fois de la dose et de la durée du traitement, des comorbidités associées et surtout de la prise simultanée d'AINS (Hochberg, 2015).

IV. NGF et douleur articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde

Les patients polyarthritiques présentent une augmentation de la concentration en NGF et de son récepteur spécifique TrkA au niveau du liquide et du tissu synovial (Aloe *et al.*, 1992; Barthel *et al.*, 2009; Raychaudhuri *et al.*, 2011a). Ces augmentations sont aussi retrouvées dans les modèles animaux d'arthrite inflammatoire comme dans le modèle carragénine (Aloe, Tuveri and Levi-Montalcini, 1992) ou dans le modèle d'arthrite induite par l'injection d'adjuvant complet de Freund (CFA) (Wu, Nagata and Iijima, 2000; Ängeby Möller *et al.*, 2015).

Le NGF pourrait donc participer aux symptômes douloureux dans la PR en modulant différentes composantes de la pathologie. La première composante est l'inflammation. En effet, nous avons pu voir que dès le stade précoce, la PR est caractérisée par une inflammation et la concentration de NGF est augmentée en condition inflammatoire. De plus nous avons pu voir que le NGF participe à la sensibilisation périphérique et centrale de la douleur. Ainsi, l'augmentation du NGF dès un stade inflammatoire de la PR pourrait contribuer au développement et au maintien des symptômes douloureux. De plus, le NGF pourrait au niveau des sites inflammatoires agir à la fois au niveau des FLS et des lymphocytes T mémoires : acteurs clés de la cascade des maladies rhumatismales auto-immunes (Raychaudhuri *et al.*, 2011). En outre, le NGF est capable d'induire une néoinnervation des fibres nociceptives et donc de participer à la composante « neuropathique » de la PR chez certains patients (Denk, Bennett and McMahon, 2017).

La deuxième composante sur laquelle le NGF pourrait avoir une action mais qui reste encore méconnue, particulièrement dans la PR, est le remodelage osseux. En effet, dans les premières études utilisant des anti-NGF, il a été montré une augmentation des fractures spontanées et une accélération des arthropathies destructrices comme nous l'avons mentionné précédemment. De manière intéressante, le NGF stimule le remodelage osseux et améliore la consolidation osseuse suite à une fracture (Asaumi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Le NGF est aussi capable de stimuler la formation des ostéoclastes, puisque l'ajout de NGF dans des cultures de monocytes va induire la formation de cellules multi-nucléées TRAP⁺ (Hemingway *et al.*, 2011; Sabokbar *et al.*, 2016). Ainsi, les effets indésirables observés pourraient résulter d'une modulation directe du métabolisme osseux par le NGF.

Ainsi plusieurs évidences directes et indirectes suggèrent un rôle important du NGF dans les différents mécanismes physiopathologiques de la PR mais des études restent néanmoins nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes de son implication dans cette pathologie. En outre, la question de l'inhibition d'un facteur aussi pléiotropique que le NGF se pose au vue de certains effets indésirables. Ainsi, une meilleure connaissance des voies de signalisation en aval du NGF qui seraient impliquées spécifiquement dans le développement et le maintien d'une part, des symptômes

douloureux et d'autre part, dans l'intégrité de l'articulation et particulièrement de l'os, pourraient permettre d'aboutir à de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées.

CHAPITRE 4 : Objectifs

L'ensemble des données rapportées dans l'introduction bibliographique souligne le manque de prise en charge de la douleur chronique dans la polyarthrite rhumatoïde, que ce soit à un stade précoce (arthralgie) ou à un stade établi. Ceci est notamment dû à des lacunes dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mise en place et le maintien des symptômes douloureux.

Le *Nerve Growth Factor* joue un rôle crucial dans la mise en place et le maintien des symptômes douloureux en condition pathologique. Le projet central de ma thèse s'est donc articulé autour de la question suivante : **Quelle est l'implication des voies de signalisation intracellulaires NGF/TrkA dans la douleur chronique ?** Pour faire suite à un projet initié préalablement par Tanguy Chaumette (post-doctorant), j'ai complété son étude portant sur l'implication de ces voies dans des contextes de douleur somatique (superficielle de douleur post-opératoire) et viscérale (modèle de cystite) qui a fait l'objet d'un article présenté comme l'Article n°1. Puis, étant donné, l'intérêt majeur du NGF dans la douleur articulaire, nous avons élargie cette question à un contexte de douleur inflammatoire articulaire (arthrite). Cette étude fait l'objet de l'Article n°2. Ces deux études ont utilisés une approche génétique originale par l'utilisation de souris exprimant un récepteur chimérique TrkA/C.

De manière intéressante, les mécanismes sous-tendant la douleur articulaire à un stade préclinique de la polyarthrite rhumatoïde où l'on parle plutôt d'arthralgie, restent encore mal connus. L'une des hypothèses actuelles met en avant un rôle clef des anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) dans l'arthralgie. Dans ce contexte, nous avons tenté de répondre à la question suivante : **Quels sont les mécanismes à l'origine du développement et du maintien de l'arthralgie induite par les ACPA dans la polyarthrite rhumatoïde précoce et quelle place pour le canal sensible aux protons ASIC3 ?** Cette étude a fait principalement l'objet d'une collaboration internationale avec le laboratoire du D^r Camilla Svensson au Karolinska Institute de Stockholm en Suède et a donné lieu à un article présenté en tant qu'Article n°3.

PARTIE B Résultats Expérimentaux



Page | 105

Article n° l

c-Jun / p38 MAPK / ASIC3 pathways activated by NGF through TrkA is essential for mechanical allodynia development following somatic injury and to a lesser extent visceral injury

Chaumette T^{I^*} , **Delay L**^{I*}, Barbier J^I, Boudieu L^I, Aissouni Y^I, Lashermes A^I, Legha W^I, Antraigue S^I, Carvalho F^I, Eschalier A^I, Ardid D^I, Moqrich A², Marchand F^{I†}

Article n°2

Specific TrkA signalling pathways are essential for mechanical hypersensitivity development and bone remodelling in arthritis using knock-in TrkA/C mice

Delay L¹, Barbier J¹, Boudieu L¹, Aissouni Y¹, Ardid D¹, Briat A², Auzeloux P², Miot-Noirault E², Moqrich A³, Marchand F^{1†}

I. Avant-propos pour les Articles n°I & n°2

I.I. Le modèle de souris TrkA/C

La stratégie choisie pour étudier l'implication des voies de signalisation NGF/TrkA, dans ces deux études a été d'utiliser un modèle de souris génétiquement modifiées pour le récepteur de haute affinité au NGF, le récepteur TrkA. Nous avons, grâce à une collaboration avec l'équipe d'Aziz Moqrich de l'institut de biologie du développement de Marseille Luminy, pu tirer profit de la genèse de souris génétiquement modifiées viables pour les voies de signalisation NGF/TrkA. La stratégie choisie par cette équipe a été de développer des souris *knock-in* pour le récepteur TrkA par transgénèse substitutive dont la construction génétique est présentée en **Figure 45**.





Les souris TrkA/C ont été générées grâce à une stratégie ciblée de transgénèse substitutive basée sur la recombinaison homologue. Le locus natif du gène *TrkA* ou *Ntrk1* murin est présenté en haut de ce schéma puis au milieu le locus après recombinaison homologue et en bas le locus après excision de la cassette neo. La partie extracellulaire de la protéine chimérique TrkA/C est codée par les 10 premiers exons du *TrkA* endogène afin d'assurer une expression propre des ARN messagers TrkA/C. Les parties transmembranaire et intracellulaire de la protéine TrkA/C sont codées par l'ADNc de TrkC (*Ntrk3*). L'expression du transgène se fait sous le contrôle du promoteur PGK dans les cellules ES. La forme mature de TrkA/C fait environ 140 kDa (d'après **Gorokhova et al., 2014**).

IRES : *internal ribosome entry site*, **pA** : queue polyadénylée, **PGK** : promoteur permettant l'expression dans les cellules ES, **NEO** : néomycine (sélectionnée en utilisant G418).



Les souris TrkA/C expriment donc un récepteur chimérique TrkA/TrkC (TrkA/C) au lieu du récepteur TrkA. Comme représenté ci-contre, ce récepteur chimérique comprend la partie extracellulaire du récepteur TrkA capable de lier normalement le NGF et les parties transmembranaire et intracellulaire fonctionnelles du récepteur TrkC : récepteur à la neurotrophine 3. Ainsi la liaison du NGF au récepteur TrkA/C va activer, non pas les voies de signalisation en aval de TrkA, mais celles en aval du récepteur TrkC.

Comme tout modèle animal génétiquement modifié, ces souris possèdent quelques caractéristiques qui lui sont propres : (1) l'expression du récepteur TrkA est complètement remplacée par celle du récepteur chimérique TrkA/C, (2) les souris *knock-in* TrkA/C possèdent une diminution modeste du nombre de neurones par DRGs laissant supposer un développement normal des neurones, (3) les souris *knock-in* TrkA/C présentent une ségrégation normale des fibres nociceptives en neurones peptidergiques et non peptidergiques et (4) les projections périphériques des fibres nociceptives sont drastiquement diminuées chez les souris *knock-in* TrkA/C (Gorokhova *et al.*, 2014).

I.2. Modèles de douleurs

1.2.1 Modèles de douleur somatique

a. Modèle de douleur somatique superficielle – douleur post-opératoire

Pour la douleur somatique superficielle, nous avons choisi d'utiliser un modèle de douleur post-opératoire aussi appelé modèle de Brennan (Brennan, 2011). Ce modèle consiste, sous anesthésie gazeuse, à inciser sur un centimètre la peau et le fascia de la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal (**Figure 46**) suivi d'une incision longitudinale du muscle fléchisseur des digits de la patte. Ce modèle de douleur somatique superficielle est marqué par le développement d'une hyperalgie thermique du 1^{er} au 5^{ème} jour avec un rétablissement total de l'animal au bout de 7 à 10 jours. A cela, s'ajoute le développement d'une hyperalgie mécanique du 1^{er} jour jusqu'au 5^{ème}-10^{ème} jour.



Figure 46 : Modèle Brennan de douleur post-opératoire

Pour ce modèle d'incision plantaire, l'animal est anesthésié par isoflurane puis la patte postérieure est incisée sur I cm à 0,5 cm du fascia jusqu'au bord du talon (**A**). Une fois relevé (**B**), le muscle fléchisseur est incisé longitudinalement (**C**) puis la peau est refermée avec une suture nylon (**D**) (d'après **Brennan, 2011**).

b. Modèle de douleur articulaire inflammatoire

Pour la douleur articulaire inflammatoire, nous avons choisi un modèle de monoarthrite (MoAr) induit par l'injection unilatérale (12 μ l) d'Adjuvant Complet de Freund (CFA) au niveau de l'articulation tibiotarsienne de la patte postérieure droite de l'animal, la patte contralatérale étant

utilisée comme contrôle (A. Khairnar *et al.,* 2015). Ce modèle mime une arthrite inflammatoire à un stade établi.

1.2.2 Modèle de douleur viscérale inflammatoire – cystite

Le modèle de douleur viscérale choisi a été un modèle de cystite aiguë induit par l'injection intrapéritonéale de cyclophosphamide (CYP) injectée à la dose de 150mg/kg (Augé *et al.*, 2013) (**Figure 47**).



Figure 47 : Modèle de cystite induit par l'injection de cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est transformé au niveau hépatique en différents métabolites dont le 4-hydroxy-cyclophosphamide qui peut ensuite conduire à la production de la moutarde phosphoramide qui possède un effet cytotoxique et à la production de l'acroléine qui est toxique et est éliminée par la vessie. Dans la vessie, son pourra accumulation entrainer le développement à forte dose d'une cystite hémorragique. Cette cystite entraine une hyperactivité du détrusor, une diminution de la capacité de la vessie, des douleurs pelviennes et est marquée par une inflammation importante.

Ce modèle n'a été que peu introduit dans l'introduction bibliographique, c'est pourquoi je vais présenter quelques résultats clés de la littérature justifiant l'utilisation de ce modèle pour étudier l'implication des voies de signalisation NGF/TrkA dans la douleur viscérale.

En clinique, tout d'abord, les taux de NGF sont augmentés chez les patients présentant une cystite interstitielle associée à des douleurs chroniques (Chang *et al.*, 2016). Chez le rat, l'utilisation d'un anti-NGF diminue significativement les symptômes douloureux dans un modèle de cystite induit par l'instillation d'acroléine (Guerios *et al.*, 2008). De manière intéressante, il a été observée une augmentation de l'expression du récepteur TrkA au niveau vésicale et des neurones des DRGs innervant la vessie (*i.e.* L6-S1) suite à l'induction d'une cystite par le CYP chez un modèle murin (Murray *et al.*, 2004). L'activation de TrkA par le NGF participe à une sensibilisation des afférences nerveuses de la vessie et conduit *in fine*, au niveau fonctionnel, à une hyperactivité du détrusor (Murray *et al.*, 2004). Ainsi, il semble qu'un lien fort existe entre NGF et la douleur viscérale retrouvée dans la cystite et justifie l'utilisation d'un modèle de cystite dans nos études.

2. Présentation de l'Article l

Comme présenté dans les objectifs, j'ai pris la suite des travaux débutés par Tanguy Chaumette pendant son post-doctorat au sein de l'unité U1107 qui portaient sur le rôle des voies NGF/TrkA dans la douleur somatique et viscérale et a fait l'objet de cet Article n°1.

Le NGF joue un rôle crucial suite à une lésion tissulaire ou en contexte inflammatoire et participe *via* l'activation de ces récepteurs TrkA et, dans une moindre mesure p75^{NTR}, à la mise en place et au maintien des symtômes douloureux. L'utilisation d'anti-NGF a démontré un rôle important de ce facteur dans plusieurs contextes douloureux dont la douleur somatique et viscérale. Mais les mécanismes précisément impliqués dans la mise en place de certains symptômes comme l'allodynie/hyperalgie mécanique induite par le NGF, restent encore à élucider.

Le but de cette étude a été de mieux caractériser les mécanismes sous-tendant le développement de l'hyperalgie mécanique induite par le NGF *via* son récepteur TrkA et les voies de signalisation intracellulaires spécifiques associées, dans des modèles de douleurs somatique et viscérale.

Afin de mieux caractériser ces mécanismes et par quelles voies de signalisation le NGF participe au développement de l'hypersensibilité mécanique somatique et viscérale, nous avons réalisé une étude chez des souris génétiquement modifiées pour le récepteur TrkA au NGF, le modèle de souris TrkA/C (présenté en avant-propos Article 1 : I. 1.1) dans un modèle somatique de douleur post-opératoire et viscérale de cystite.

Cette étude a démontré une diminution significative et spécifique de l'hypersensibilité mécanique chez les souris TrkA/C suite à l'induction d'un modèle de douleur post-opératoire et dans une moindre mesure de douleur viscérale. Ces résultats suggèrent un rôle spécifique des voies de signalisation intracellulaires de p38 MAPK et de c-Jun activées par TrkA dans la mise en place de l'hypersensibilité mécanique notamment dans le modèle de douleur post-opératoire. Enfin, cette hypersensibilité pourrait directement dépendre de l'activation et la sensibilisation des canaux ASIC3.

Article n°l

c-Jun / p38 MAPK / ASIC3 pathways activated by NGF through TrkA is essential for mechanical allodynia development following somatic injury and to a lesser extent visceral injury

Chaumette T^{1*} , **Delay L**^{1*}, Barbier J¹, Boudieu L¹, Aissouni Y¹, Lashermes A¹, Legha W¹, Antraigue S¹, Carvalho F¹, Eschalier A¹, Ardid D¹, Moqrich A², Marchand F^{1†}

1. Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 NEURO-DOL, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

2. Institut de Biologie du Développement de Marseille Luminy, UMR 6216 CNRS-Université de la Méditerranée, Campus de Luminy case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France.

 <u>Corresponding author</u>: Fabien Marchand. Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 NEURO-DOL, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000
Clermont-Ferrand Cedex 01, France.

Tel: +33 473178230; Fax: +33 473274621. Email address: <u>fabien.marchand@uca.fr</u>

*These authors contributed equally to this work

Abstract

Nerve growth factor, a prototypic neurotrophin, is well known to significantly participate to pain signalling by binding specifically to the TrkA receptors. Here, we took the advantage of a generated knock-in mouse model expressing a chimeric receptor TrkAC, formed by the extracellular part of TrkA and the functional transmembrane and intracellular part of TrkC, the specific receptor of neurotrophine 3, to identify the specific TrkA pathways involved in chronic pain. Disrupting TrkA specific pathways lead to a profound and specific deficit in mechanical hypersensitivity development following somatic and to a lesser extent, visceral injuries. Indeed, thermal hyperalgesia and peripheral inflammation development in TrkAC mice was not different TrkA transduction pathways (*i.e.* Akt, p38 MAPK and c-Jun) especially p38 MAPK, in the DRG cell bodies of TrkAC mice could ultimately lead to the deficiency in mechanical hypersensitivity development through an alteration of ASIC3 channel expression.
Introduction

Following tissue injury or chemical insult, several substances are released within the local tissue environment, ultimately changing the excitability of nociceptors. One of these substances is the nerve growth factor (NGF), a prototypic neurotrophin, which is critical for the development and maintenance of autonomic and sensory neurons, including nociceptors, in the developing nervous system (Lewin, Lechner and Smith, 2014; Denk, Bennett and McMahon, 2017). In the adult, NGF is well known to significantly participate to pain signalling by binding to p75^{NTR} and, specifically to the TrkA receptors (Lewin, Lechner and Smith, 2014; Mizumura and Murase, 2015; Denk, Bennett and McMahon, 2017). Systemic or local administration of NGF in rodents and human results in profound and long lasting heat and mechanical hypersensitivity (Lewin, Ritter and Mendell, 1993). By contrast, 1) sequestration of free NGF (neutralization of NGF by TrkA-immunoglobulin G (IgG) fusion molecule); 2) prevention of NGF binding and activation of TrkA and 3) inhibition of TrkA function prevent the sensitization of nociceptors in several pain models (for review (Lewin, Lechner and Smith, 2014; Mizumura and Murase, 2015; Denk, Bennett and McMahon, 2017; Miller, Block and Malfait, 2017)). Thus, humanized blocking antibodies directed against NGF show remarkable analgesic potency in clinical trials for various painful conditions such as osteoarthritis, low back pain, and interstitial cystitis (Lane et al., 2010; Evans et al., 2011; Leite et al., 2014; Nickel et al., 2016). Anti-NGF drug has the potential to make a major impact on chronic pain treatment in the near future. However, the long-term efficacy and safety profile of anti-NGF antibodies are yet to be well established (Hochberg, 2015; Bannwarth and Kostine, 2017). Therefore, it is crucial to better understand the precise pathways and mechanisms that are controlled by NGF to both initiate and sustain chronic pain since activation of TrkA by NGF activates various intracellular pathways such as PLCy/PKC pathway, phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI₃-K) (York et al., 2000), mitogen-activated protein kinase kinase/mitogen-activated protein kinase pathways (MAPKK/MAPK) including Erks, JNKs, and p38 MAPK (Minden et al., 1994; Xing et al., 1998; Klesse and Parada, 1999; Patapoutian and Reichardt, 2001) which are unlikely to be all involved in pain signaling.

Since mice lacking TrkA or NGF died shortly after birth, we took the advantage of our generated knock-in mouse expressing a chimeric receptor TrkAC, formed by the extracellular part of TrkA and the functional transmembrane and intracellular parts of TrkC, the specific receptor of neurotrophin 3 (Gorokhova et al., 2014). Thus, NGF can bind normally to this chimeric receptor such as the native TrkA receptor, but activates only the specific intracellular pathways downstream of TrkC and the common pathways of TrkA and TrkC. As demonstrated previously, the intracellular parts of these two receptors are interchangeable in vivo for supporting nociceptor survival and maturation with a normal segregation of nociceptors into peptidergic and nonpeptidergic neuronal populations in the TrkAC adult mice. However, while TrkAC mice presented normal central innervation, they exhibited a profound reduction in peripheral, mostly peptidergic fibers, in the skin. Intriguingly, these mice seem to present only a deficit in mechanical but not thermal hypersensitivity following intraplantar CFA injection. However, the expression of both mechanosensory TrkB positive fibers and Ret in large diameter neurons, representing the "early Ret" population of rapidly adapting mechanoreceptors, remained unchanged in TrkAC mice (Gorokhova et al., 2014). Thus, the aim of our study was to extend and further explore if this specific mechanical hypersensitivity deficit is found in others somatic and also visceral pain models. To assess if this could be regulated by different NGF dependant mechanosensitive neuronal populations at the somatic and visceral levels and to finally investigate which specific NGF/TrkA-activated pathways were disrupted.

Methods

Animals

TrkAC animals and WT-littermates from C57Bl/6J background were bred in our animal facility and housed in a controlled room with a 12-hour light/dark cycle, with free access to food and water. All procedures were approved by the local ethical committee (Comité Régional d'éthique en matière d'expérimentation animale Auvergne (CEMEA-Auvergne)) and in accordance with European Communities Council Directive for the care of laboratory animals (86/609/EEC). Experiments followed guidelines of the International Association for the Study of Pain and ARRIVE (Zimmermann, 1983; Rice *et al.*, 2008).

Only female TrkAC and WT-littermates (12 weeks old) have been used for the visceral pain model induced by cyclophosphamide administration and both male and female for colorectal distension. Only male TrkAC and WT-littermates (12 weeks old) have been used for the somatic pain models (plantar incisional pain model and systemic NGF injection induced pain) except for intraplantar capsaicin where female/male TrkAC and WT-littermates were used.

All experiments were performed in a randomized block design to control variability and avoid any unspecific effects across the experiment. The experimenter was blind regarding the genotype (WT or TrkAC mice) and treatment administered (*i.e.* cyclophosphamide, NGF or surgery).

Pain models

Plantar incisional pain model

A previously described plantar incisional pain model was used (Brennan, Vandermeulen and Gebhart, 1996). Animals were anesthetized with 1.5-2% isoflurane and the skin of the operated paw was cleaned with povidone iodine 10% (Merck) and placed in the hole of a sterile drape. The glabrous skin and fascia of the left hind paw was incised longitudinally, starting 0.2 cm from the proximal edge of the heel and the underlying flexor muscle was elevated, divided, and retracted. After hemostasis, the skin overlying the muscle was closed with two sutures of 5.0 polyamide monofilament (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Animals were allowed to recover from anaesthesia. n=8 animals in each group (WT incision and TrkAC incision).

Systemic NGF injection induced pain

The NGF evoked pain model has been used as previously described (Lewin, Ritter and Mendell, 1993; Kerr *et al.*, 2001). Briefly, NGF (2.5S, Sigma Aldrich) was administered subcutaneously (0.1mL/10g) at the dose of 1mg/kg. Paw mechanical and thermal threshold (see below) were assessed 24h before NGF injection and at 4h, 6h, 24h and 1h, 6h, 24h following NGF injection, respectively. n=8 animals in each group (WT + NGF and TrkAC + NGF).

Capsaicin-induced spontaneous behaviour

Following acclimation in individual Plexiglas boxes, mice were injected with a single intraplantar subcutaneous dose of capsaicin $(1.5\mu g/20\mu L/mice, Sigma-Aldrich)$ as described previously (Sakurada *et al.*, 1992; O'Brien *et al.*, 2013). Spontaneous nocifensive behaviours (*i.e.* licking, biting, lifting, and flinching) of the injected paw were measured for 5 minutes following capsaicin administration.

Cyclophosphamide induced-cystitis

Cystitis was induced by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CYP, Leancare Ltd, UK). Animals received either cyclophosphamide (150 mg/kg in 0.9% NaCl) or vehicle (0.9% NaCl) (Lai *et al.*, 2017). n=8 animals in each group (WT + saline, TrkAC + saline, WT + CYP and TrkAC + CYP).

Behavioural pain tests

Assessment of paw mechanical allodynia in systemic NGF and the plantar incisional pain models

Paw mechanical sensitivity in NGF and plantar incisional pain models was assessed using von Frey's hairs based on the up-down method developed by Chaplan (Chaplan *et al.*, 1994) and modified by Dixon (Dixon, 1980). Von Frey's hairs used were: 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4g. Animals were acclimatised for at least 1h in individual clear acrylic cubicle (22 × 16.5 × 14 cm) placed on the top of an elevated wire mesh. The filaments were applied on the left pathological hind paw with a 5 min interval between stimuli. Quick withdrawal or licking of the paw to the stimulus was considered a positive response. Threshold values were derived according to the method described by Chaplan (Chaplan *et al.*, 1994). If the animal showed no response to the highest von Frey hair, the von

Frey threshold of 1.4 g was assigned. If the animal showed response to all von Frey hairs, the von Frey threshold of 0.02 g was assigned. The 50% paw mechanical threshold was evaluated before and 2h, 24h and 48h following paw incision, and before and 4h, 6h, 24h following NGF administration.

Assessment of referred mechanical allodynia in the cystitis model

Abdominal mechanical sensitivity in the CYP induced cystitis model was assessed with von Frey's hairs using the up-down method developed by Chaplan (Chaplan *et al.*, 1994) and modified by Dixon (Dixon, 1980), von Frey's hairs used were similar as those used for paw. Briefly, animals were acclimatised for 1h on an elevated wire mesh in individual clear acrylic cubicle (22 × 16.5 × 14 cm) placed on the top of an elevated wire mesh. Abdominal stimulation was then realised starting with the middle 0.16g hair and follow by up and down stimulation. Quick withdrawal/licking of the abdomen or biting of the hair to the stimulus was considered a positive response. The 50% abdominal mechanical threshold was determined before and 4h, 24h and 48h following CYP administration.

Assessment of thermal hyperalgesia in systemic NGF and the plantar incisional pain models

Thermal hyperalgesia was assessed in systemic NGF and plantar incisional pain models using the plantar test as previously described (Hargreaves *et al.*, 1988). Each animal was placed in a clear acrylic cubicle ($22 \times 16.5 \times 14$ cm) on top of a glass floor in a temperature controlled room (~22°C) and allowed to acclimatise for 1h before testing. The left paw was stimulated with a radiant heat source (Bioseb) placed under the glass floor. Withdrawal latencies were averaged over three consecutive tests, at least 10 min apart, in response to the thermal challenge from a calibrated radiant light source (output of 190 mW/cm2). A cut-off of 20s was imposed to prevent any tissue damage. Thermal threshold was assessed 24h before and 2h, 24h and 48h following paw incision and 1h, 6h and 24h following NGF administration.

Guarding pain and paw thickness in plantar incisional pain model

Guarding pain was evaluated in the plantar incisional pain model as previously described (Deval *et al.*, 2011). Animals were placed in individual plexiglass boxes on the top of an elevated wire mesh. Using an angled magnifying mirror, the incised paw was viewed. The paw of each animal was closely observed during 10 minutes period and the number of paw flinches was recorded. Paw

thickness was assessed on the ipsilateral and contralateral paws 2h and 48h after paw incision using a Vernier Caliper. Data are expressed in mm.

Cystometry

Animals were anesthetized with a mixture of xylazine hydrochloride (Rompun[®], 0.4 mg/kg) and ketamine (Imalgene 500[®], 100 mg/kg) and placed in a supine position. Abdominal skin was shaved, cleaned with povidone iodine 10% (Merck) and the abdomen carefully opened to expose the bladder. A PE10 catheter with a collar was then inserted through the apex of the bladder and secured with 5.0 sutures (Ethicon, Somerville, NJ, USA). The bladder was then emptied. Perfusion of NaCl 0.9% was realized at the rate of 20μ L/min. After bladder instillation started, the system was allowed to stabilize to achieve a stable contraction/voiding pattern prior to data collection for analysis. Recording of intra-bladder pressure was then realized for at least 1h with a pressure transducer (Harvard Apparatus, USA) connected to a catheter with a three way tap with the fluid filled pressure at one end, and injection pumps (Harvard Apparatus, USA) to the other. The pressure transducer was connected to a preamp (Harvard Apparatus, USA), amplified (Power-Lab®, AD Instruments, Oxford, UK) and recorded on a computer running Labchart® (AD Instrument, Oxford, UK). Voided volume was collected on a pre-weighted cotton swab for each voiding contraction. Analysis of the pressure recording allow to measure inter contraction interval, maximum contraction amplitude, resting pressure, threshold pressure and maximum bladder pressure, as previously described (Andersson, Soler and Füllhase, 2011).

Colorectal distension

Mice colonic sensitivity in naive WT and TrkAC mice was assessed by quantifying visceromotor response (VMR) with abdominal electromyogram recordings in response to colorectal distension (CRD) (Christianson and Gebhart, 2007). Prior to colonic sensitivity measurement, mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection with a mixture of xylazine hydrochloride (Rompun[®], 0.4 mg/kg) and ketamine (Imalgene 500[®], 100 mg/kg), the left abdominal external musculature was exposed by skin incision and two nickel-chromium electrodes (Nikrothal 80, Kanthal, Sweden) were implanted into the abdominal oblique muscle. Electrodes were secured with

5-0 sutures (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Skin wound was then closed with 3-0 sutures. The opposite electrode ends were externalized subcutaneously through an incision at the back of the neck and wrapped around a polyethylene catheter attached to the skin with three 3-0 sutures (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Mice were allowed to recover at least five days before experiments.

On the experimental day, mice were acclimatised to the restraint device for 3h before colorectal distension. They were then briefly anaesthetized (1.5% Isoflurane) to insert the distension probe (Fogarty Arterial Embolectomy Catheter 4, Edward Life science, CA, USA) at 1cm from the anal margin, and a nickel-chromium reference electrode (Nikrothal 80, Kanthal, Sweden) was inserted subcutaneously within the tail. Animals were replaced in the restriction cages and allowed to recover for 30 min prior to colorectal distension. Electrodes were connected to a Bio-Amp® recording system (AD Instruments, Oxford, UK) linked to an acquisition interface device (Power-Lab®, AD Instruments, Oxford, UK). Electromyographic signal was amplified, filtered at 100Hz, integrated and smoothed. Colorectal distension was performed by inflating the distension probe from 20µL to 100µL, by 20µL incremental step. A 5min interval period was observed between each stimulation. Recording was performed 10s before stimulation (baseline) and 10s during the stimulation period. Visceromotor responses were quantified as the area under the electromyogram activity curve during the 10s stimulation period minus the area measured during the 10s baseline.

IL-6 and NGF ELISA

At two time points of the behavioural experiments (*i.e.* 4h and 48h following CYP administration and 2h and 48h following plantar incision), 4-5 animals in each group at each time point were terminally anaesthetised using pentobarbitone and quickly dissected out. The bladder and the incised paw skin for the cystitis pain model and the incisional pain model, respectively, were excised and snap frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were subsequently homogenized in lysis buffer (137mM NaCl, 20mM TrisHCl, 1% NP40, 10% glycerol, 1mM PMSF, 10µg/mL aprotinin, 1µg/mL leupeptin, 0.5mM sodium vanadate) using a glass homogenizer. Homogenates were then centrifuged at 14,000 x g for 10min at 4°C and supernatants were collected. Whole cell lysates were next titrated to determine their protein concentrations using a BCA Protein Assay kit (Pierce, UK).

Interleukin-6 (IL-6) content was measured using DuoSet Elisa (#DY406, R&D system, Minneapolis, USA). IL-6 content was determined using a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique according to the manufacturer's guidelines. NGF content was measured only in the bladder using NGF E_{max} ImmunoAssay System (#G7631; Promega, USA) according to manufacturer's procedure. For both IL-6 and NGF Elisa, samples were processed in triplicate and values were calculated from the standard samples curve in the linear range. IL-6 and NGF contents in the bladder and only IL-6 in the paw skin were assessed 2h and 48h and 4h and 48h, respectively, after injuries.

Quantitative PCR of NGF/TrkA signalling pathways in lumbar DRGs following plantar incision in WT and TrkAC mice

To investigate changes in the NGF/TrkA signaling pathways in the plantar incision and cystitis models, we performed quantitative PCR (qPCR) on DRGs 48h after incision or CYP administration. WT and TrkAC mice (n=3-5) were terminally anaesthetised using pentobarbitone and ipsilateral and contralateral lumbar DRGs (L4, L5, L6 and L6, S1 for the plantar incision and cystitis models, respectively) were quickly dissected out, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. Total RNA was extracted using Quick-RNA_MicroPrep kit (ZymoResearch, Epigenetics, USA) according to the manufacturer's protocol. The concentration of RNA was quantified using Take3 nucleic acid quantification plate (Epoch, BioTek, USA). Equal amounts of RNA from each sample were reverse transcribed in a volume of 20µl to produce cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's recommendation.

SYBR Green-based detection was carried out on a real-time PCR instrument (RealPlex, Eppendorf, GmBH) with thermal cycler conditions of: 95 °C for 30s, followed by 45 cycles (95 °C for 10s, 59 °C for 15s and 72°C for 15s). In each experiment, samples were assayed in triplicate. Data were analyzed using the threshold cycle (Ct) relative quantification method. Relative quantities (RQ) were determined using the equation: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. β -Actin was used as housekeeping gene. Forward and reverse primers used are presented in Table 1.

Gene	Primer sequences (5'→3')
Aktl	F : GACGTAGCCATTGTGAAGGA (20) R : CATCGTTCTTGAGGAGGAAGTAG (23)
Mapk I 4	F : CTATGGCTCGGTGTGTGCT (19) R : GACGCAACTCTCGGTAGGTC (20)
Mapk3	F : AATTGGTCAGGACAAGGGCT (20) R : GAGTGGGTAAGCTGAGACGG (20)
Mapk I	F : TCCATTCAGCTAACGTTCTGC (21) R : GTACTCTGTCAAGAACCCTGTG (22)
Prkcz	F : GGCTGCAAGACTTCGACCTCATC (23) R : CTGGACGCCTGCTCAAACACATGT(24)
Jun	F : CTCCGGACTGTTCATCCGTT (20) R : GGGACTCTCCAAATGCTCCC (20)
Mapk7	F : GTTCATCTCAGACCCACCTTTC (22) R : TAGAGTCTCCTGGTCCTGTTATG (23)
Piezo2	F : ACGGTCCAGCTTCTCTTCAA (20) R : CTACTGTTCCGGGTGCTTG (19)
Prkaca	F : GTCATGGAGTATGTAGCTGGTG (22) R : CAGATACTCAAAGGTCAGGACG (22)
Prkca-1	F : GAAGGGCACATCAAAATCGC (20) R : CACCAATCTACAGACTTCCCG (21)
Chrna3	F : ATCCAGTTTGAGGTGTCTATGTC (23) R : CTTGGTAGTCAGAGGGTTTCC (21)
TrpvI	F : CCCGGAAGACAGATAGCCTGA (21) R : TTCAATGGCAATGTGTAATGCTG (23)

Table 1 : Forward and reverse primers

Retrograde labelling of bladder DRG neurons

A retrograde labelling of DRG neurons specifically innervating the bladder was realized one week before saline or CYP administration. Animals were anaesthetized with 2% isoflurane. Following a laparotomy, the bladder was carefully exposed. Eight μ L of fluorogold (#39286; Hydroxystilbamidine bis (methanesulfonate), Sigma Aldrich) were very slowly administered in four different injection sites (2 μ L per site) in the dorsal bladder wall. Great care was taken to not go through the bladder wall. For each injection, the needle was left in the bladder wall for at least 1min to avoid leaking. The injection sites were then wiped and the bladder thoroughly washed with NaCl 0.9%. The bladder was then replaced in the abdominal cavity and the abdominal muscles wound closed with 5.0 sutures (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Wound skin was closed with 3.0 sutures (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Résultats expérimentaux - Article nº I

Western immunoblotting

Forty eight hours after paw incision, WT and TrkAC animals (n=10 in each group) were terminally anaesthetized with pentobarbitone, ipsilateral and contralateral L4-L5-L6 DRGs were dissected out and snap frozen in liquid nitrogen. The DRGs of two animals (*i.e.* 6 DRGs in total) of the same genotype were pooled together and homogenized in RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS + 0.5% Deoxycholic acid containing complete protease inhibitor cocktail) using a glass homogenizer. Homogenates were then centrifuged at 14000 x g for 10 min at 4°C and supernatants were collected. DRGs whole cell lysates were next titrated to determine their protein concentrations using a BCA Protein Assay kit (Pierce, UK).

For Western immunoblotting, laemmli loading buffer was added to the samples and heated at 70°C for 30 min. The DRG homogenates (40 μ g protein) were separated using 4-20% SDS-PAGE pre-cast polyacrylamide gels. The separated proteins were then transferred to nitrocellulose membranes using Trans-Blot Turbo blotting system (Bio-Rad, USA). All membrane incubations were performed on a rotating plate. Washes were done in TBS-T (50 mm Tris-HCl and 6 mM NaCl containing 0.1% Tween 20). Blocking of unspecific binding sites was done by incubating the membranes in 5% non fat dry milk in TBS-T or 5% BSA in TBS-T where is indicated for 1 hour at room temperature. The membranes were then incubated with the primary antibodies (Cell Signalling Technology) diluted in 5% non fat milk in TBS-T or 5% BSA in TBS-T overnight at 4°C. After washing, the membranes were probed with appropriate Horseradish peroxidase conjugated secondary antibody diluted at 1:10,000 with 5% non fat dry milk in TBS-T or 5% BSA in TBS-T or 5% BSA in TBS-T for 1 hour at room temperature. Antibodies to phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182, 1:2,000; catalog #9216), p38 MAPK (1:1,000; catalog #8690) were diluted in 5% BSA in TBS-T, phospho-Akt (ser473, 1:1,000; catalog #9272), total Akt (1:1000; catalog #9272) were diluted in 5% non fat milk in TBS-T. β-actin (1:5,000; Sigma) was used as loading control.

The immunoreactive bands were quantified by densitometric analysis using Bio-Rad imaging software (Chemidoc). Phospho bands of p-Akt and p-p38 MAPK were normalized relative to total Akt and p38 MAPK, respectively. Results are expressed as the mean ± S.E.M of expression

levels of contralateral and ipsilateral DRGs for each group (both ipsilateral and contralateral protein samples were run on the same gel).

Immunohistochemistry

DRG immunohistochemistry

At the end of the behavioural experiments (*i.e.* 48h following CYP or saline administration or plantar incision), 5 animals in each group and genotype (*i.e.* WT and TrkAC) were terminally anaesthetised using pentobarbitone and quickly perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). After perfusion, L6 DRGs + the bladder for the CYP model and ipsilateral L4-L5-L6 DRGs for the incisional pain model were excised, post-fixed 4h for DRGs and 12h for the bladder in the same perfusion fixative, cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB) for at least 48h at 4°C, and then frozen in tissue freezing medium (O.C.T). Transverse DRG sections (10µm) were cut on cryostat, dried for 30 min at room temperature and then stored at -20°C before staining.

DRG sections were stained as follow: after 3 washes in PBS containing 0.2% triton X-100 and 1% BSA, sections were incubated overnight at room temperature in a humid chamber with primaries antibodies (*i.e.* ASIC3, CGRP, TrkA) diluted as indicated in Table 2 in antibody diluent (#S2022; Dako). Following 5 washes 5 min each in PBS, sections were then incubated with the appropriate secondary antibodies (Table 2) diluted in the same antibody diluent for 2h at room temperature. Sections were then washed 3 times in PBS and cover-slipped with fluorescent mounting medium (Dako).

Antibodies	Dilution	Manufacturer
Guinea pig anti-ASIC3	1/200	#AB5927, Merck Millipore (France)
Rabbit anti-TrkA	1/2000	Generous gift from Dr Reichardt
Mouse anti-CGRP	1/1000	#S57053, Santa Cruz (USA)
Rabbit anti-CGRP	1/1000	#PC205, Calbiochem (France)
Rabbit anti PGP 9.5	1/400	#E3340, Spring Bioscience (USA)
Goat anti guinea pig-488	1/1000	Alexa fluor (Molecular Probes, USA)
Goat anti rabbit-546	1/1000	Alexa fluor (Molecular Probes, USA)
Donkey anti mouse-647	1/1000	Alexa fluor (Molecular Probes, USA)

Table 2: Primary and secondary antibodies

Sections were visualised under a Nikon Eclipse Ni-E fluorescent microscope run with Nikon analysis software (NiS element). DRG neurons counts were done by a blind experimenter on only L6 DRG for the cystitis model and L4-L5-L6 DRGs for the post incisional pain model (4-6 sections for each animal, n=5 per group).

Bladder and colon immunohistochemistry

Bladder cryostat cut sections (20 μ m) from the different groups were stained with the primary antibody against CGRP (rabbit anti-CGRP, 1/1000), as described above for DRG sections, to assess peptidergic innervation.

Following colorectal distension, 4 WT and 4 TrkAC mice were terminally anaesthetised using pentobarbitone and quickly perfused transcardially with NaCl 0.9% followed by 4% PFA. Colon were excised, post-fixed for 12h in the same perfusion fixative, cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 48h at 4°C, and then frozen in OCT. Transverse sections (20µm) were cut on cryostat, dried for 30 min at room temperature and then stored at -20°C before staining. Colon sections were stained with the primary antibody against CGRP (rabbit anti-CGRP, 1/1000) diluted in the antibody diluent (#S2022; Dako). Following 5 washes of 5 min in PBS, sections were incubated with the appropriate secondary antibody (goat anti-rabbit, 1/1000, Alexa fluor 488) diluted in the same antibody diluent for 2h at room temperature. Sections were then washed 3 times in PBS and coverslipped with fluorescent mounting medium (Dako).

Bladder and colon sections were visualised under a Nikon Eclipse Ni-E fluorescent microscope run with Nikon analysis software (NiS element).

Following colorectal distension, the remaining 4 WT and 4 TrkAC mice were also terminally anaesthetised using pentobarbitone and caecum, colon and spleen were freshly dissected out and weighted. Results expressed as a ratio to the total body weight of the mice taken before dissection. Total length of the colon was also measured.

Bladder histology

Bladder sections from each group (CYP or saline) and genotype (WT or TrkAC) were stained with Hematoxilin/Eosin for histology. Representative photomicrographs of bladder sections were taken using a Zeiss Scope A1 microscope running Axiovision 4.8 image analysis software.

TrkA trafficking

To assess if NGF/TrkA complex trafficking from the periphery toward the DRG cell bodies was not affected in TrkAC mice, at the same time at the left hind paw incision was made, we carefully exposed the left sciatic nerve and tightly ligated the nerve with one 5.0 suture in 2 WT and 2 TrkAC mice. 48h after the surgery, mice were terminally anaesthetised using pentobarbitone and quickly perfused transcardially with NaCl 0.9% followed by 4% PFA. After perfusion, the left sciatic nerve were excised, post-fixed for 4h in the same perfusion fixative, cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 48h at 4°C, and then frozen in OCT. Longitudinal sections (20µm) were cut on cryostat, dried for 30 min at room temperature and then stored at -20°C before staining. Sciatic nerve sections were stained with the primary antibody against TrkA (rabbit anti-TrkA, 1/2000, gift from Dr Reichardt) and the appropriate secondary antibody (goat anti-rabbit, 1/1000, Alexa fluor 546) as described above for DRG sections. Sciatic nerve sections were visualised under a Nikon Eclipse Ni-E fluorescent microscope run with Nikon analysis software (NiS element) and representative photomicrographs were taken.

Statistics

Results are expressed as mean ± standard error to mean (S.E.M). A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare more than two groups, followed by Tukey test for multiple comparisons with repeated measures when appropriate. When treatment and time were compared, a two-way ANOVA was used. When the F value was significant, this was followed by Tukey test for multiple comparisons. Neuronal DRG counting and q-PCR results have been analysed using a non-parametric Mann-Whitney test. Results were analysed with GraphPad prism 6 software (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). In all cases, the significance level was set at p<0.05.



Fig 1 : Effect of plantar incision in WT and TrkAC mice on mechanical allodynia (**A**), thermal hyperalgesia (**C**) and the number of spontaneous paw flinches (**E**) using von Frey test (up and down method), thermal plantar test and the assessment of the number of spontaneous paw flinches during 10 min, respectively. Pain behaviours were assessed before, 2h, 24h and 48h after plantar incision of the left hind paw. Effect of systemic injection of NGF (1 mg/kg, s.c. at 0.1mL/10g) in WT and TrkAC mice on mechanical allodynia (**B**) and thermal hyperalgesia (**D**) using von Frey test (up and down method) and thermal plantar test, respectively. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were assessed before, 4h, 6h and 24h and before, 1h, 6h and 24h, respectively, following systemic NGF injection. (**F**) Effect of intraplantar capsaicin injection ($1.5\mu g/20\mu L/mice$) in WT and TrkAC mice. Time spent (s) in spontaneous nocifensive behaviours (*i.e.* licking, biting, lifting, and flinching) of the injected paw was assessed for 5 minutes following capsaicin injection. n=6-8 animals per group; **A**, **B**, **C** and **D**. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * p ≤ 0.05 compared to the baseline values of WT or TrkAC groups,° p ≤ 0.05 compared to WT group. **E**. Student *t* test between WT and TrkAC groups.

Results

Somatic pain models

Pain behaviours in the plantar incisional and systemic NGF pain models

Before plantar incision, 50% mechanical thresholds (*i.e.* baseline) were not different between both genotypes (WT and TrkAC, **Fig. 1A**). Following plantar incision, WT animals exhibited mechanical allodynia from 2h to 48h, characterized by a significant decreased of 50% mechanical threshold compared to baseline (**Fig. 1A**). By contrast, TrkAC mice did not develop mechanical allodynia throughout the all study with 50% mechanical threshold similar to their baseline value (**Fig. 1A**).

Before plantar incision, baseline thermal withdrawal thresholds were not different between both genotypes (WT and TrkAC, **Fig. 1C**). Following plantar incision, WT animals progressively exhibited significant thermal hyperalgesia from 24h to 48h post-incision characterized by a significant decreased of thermal withdrawal threshold compared to baseline (**Fig. 1C**). By contrast to mechanical allodynia, TrkAC animals also develop significant thermal hyperalgesia from 24h to 48h post-incision similar to WT animals (**Fig. 1C**).

We also assessed spontaneous like pain behaviour by counting the number of spontaneous flinches of the operated paw during 10 min (**Fig. 1E**). The number of paw flinches was significantly reduced in TrkAC animals compared to WT animals 2h post-incision and still lower than WT up to 48h.

To reinforce the lack of mechanical allodynia development observed in TrkAC animals following paw incision, NGF was delivered systemically (1mg/kg, s.c.) in both genotypes. Systemic administration of NGF has been shown to induce thermal and long lasting mechanical hypersensitivity (Lewin, Ritter and Mendell, 1993; Kerr *et al.*, 2001). As expected WT mice developed both mechanical allodynia from 4h to 24h and thermal hyperalgesia from 1h to 6h, following systemic NGF administration compared to baseline (**Fig. 1B & D**). By contrast, TrkAC animals did not exhibit mechanical allodynia throughout the all study but display significant thermal hyperalgesia from 1h to 6h, similarly to WT animals (**Fig. 1B & D**).



Fig 2 : Assessment of the ipsilateral (left) and contralateral (right) hind paws thickness 2h and 48h following plantar incision in WT and TrkAC mice using a Vernier calliper (**A**). Temporal expression profiles of interleukin 6 (IL-6) (**B**) in skin of the ipsilateral (left) and contralateral (right) hind paws 2h and 48h after plantar incision in WT and TrkAC mice. Results are shown as the average of IL-6 content (μ g) per milligram of total tissue protein. n=5 per group and time point. Two-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test * p ≤ 0.05 compared to the contralateral side and to WT animals. (**C**) Representative photomicrographs of TrkA trafficking along the sciatic nerve in WT (left panel) and TrkAC (right panel) mice 48h following plantar incision. TrkA protein was accumulated in a similar manner between WT and TrkAC at the distal side of the ligation site 48h following plantar incision (scale bar, 100µm).

Capsaicin-induced nocifensive behaviour

In order to assess the response of TRPV1 positive fibres, which are mostly CGRP peptidergic fibres, mice were injected locally with capsaicin and nocifensive behaviours (*i.e.* licking, biting, lifting, and flinching) were assessed during 5 min (**Fig. 1E**). WT and TrkAC mice spent similar time in nocifensive behaviours (55.7 ± 5.5 s and 59.8 ± 6 s, respectively).

Inflammatory parameters in WT and TrkAC mice following plantar incision

As NGF is released following a painful injury and participate to inflammation phenomena through TrkA activation, we assessed paw thickness and IL-6 paw skin content following paw incision. The thickness of the ipsilateral paw significantly increased compared to the contralateral paw in WT and TrkAC mice in a similar manner 2h and 48h following paw incision (**Fig. 2A**). The increase of paw skin IL-6 content and its kinetic was similar between both WT and TrkAC animals (**Fig. 2B**). Paw skin IL-6 content was increased in the ipsilateral paw compared to the contralateral side 2h following hind paw incision (**Fig. 2B**). This increase was greater 2h post injury compared to 48h where IL-6 content was still significantly increased compared to the contralateral paw in both genotypes (**Fig. 2B**).

TrkA sciatic nerve trafficking in WT and TrkAC mice following paw incision

Since NGF biological effect is also due to the trafficking of the NGF/TrkA complex from the periphery toward the DRG cell bodies where is able to regulate genes expression, we assessed TrkA trafficking along the sciatic nerve (**Fig. 2C**). The staining of TrkA on the ligated sciatic nerve 48h after paw incision was similar between both WT and TrkAC mice with an accumulation of TrkA on the distal part of the ligature of the nerve. This suggests a comparable trafficking of NGF/TrkA complex from the periphery toward the DRG in TrkAC mice compared to WT (**Fig. 2C**).

Quantitative PCR of NGF/TrkA signalling pathways in DRG following plantar incision in WT and TrkAC mice

Forty eight hours following plantar incision, we observed a significant increase of Akt1, MAPK14 (*i.e.* P38 MAPK) and JUN mRNAs expression in the ipsilateral lumbar DRGs of WT animals



Fig 3 : Gene expression profiling of TrkA, TrkC transduction pathways in the lumbar L4-L5-L6 DRGs of WT and TrkAC animals 48h following plantar incision. Relative quantity (RQ) plot of the transcripts differentially expressed in the ipsilateral and contralateral lumbar DRGs between WT and TrkAC mice assessed by q-PCR. * $p \le 0.05$ from the RQ of the contralateral WT DRG. n=3-6 for each group. Non parametric Mann-Whitney test.



Fig 4 : Expression of phospho Ser473-Akt, total Akt, phospho Thr180/Tyr182-p38 MAPK, total p38 MAPK proteins in ipsilateral and contralateral lumbar DRGs of WT and TrkAC mice 48h following plantar incision. Representative Western blot (**A**) and quantification of phospho-Akt and total Akt (**B**) and phospho-p38 and total p38 (**C**) of WT and TrkAC mice following plantar incision. All phospho bands of p-Akt and p-p38 were normalized relative to total Akt and p38 proteins, respectively, and expressed as a ratio. n=5 for each group. One-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. ** p ≤ 0.01 compared to contralateral WT group, $^{\circ\circ}$ p ≤ 0.01 compared to TrkAC mice.

compared to the contralateral side (**Fig. 3**). By contrast, this increase in the expression of Akt, MAPK14 and JUN mRNAs levels was absent in the ipsilateral DRGs of TrkAC animals compared to the contralateral side as well as the contralateral DRGs of WT animals, where mRNAs expression were similar (**Fig. 3**). The expression levels of the others pathways investigated (ERK1, ERK2, ERK5, PKMzeta, PKA and PKC) were not different between the ipsilateral and contralateral DRGs in WT and TrkAC mice as well as between the two genotypes (**Fig. 3**). We also look at the expression of the mechanotransducer Piezo 2 and did not observed any changes in its expression between the ipsilateral and contralateral DRGs in WT and TrkAC mice as well as between the two genotypes (**Fig. 3**).

Expression of phospho-p38 MAPK and phospho-Akt in the ipsilateral and contralateral L4-L5-L6 DRGs of WT and TrkAC mice following paw incision

Our data showed a significant increase of the level of transcripts encoding Jun, Akt and p38 MAPK only in ipsilateral DRGs of WT animals. We therefore analysed by Western blotting the expression of the activated form (*i.e.* phosphorylated) of at least, Akt and p38 MAPK proteins in contralateral and ipsilateral DRGs of WT and TrkAC mice 48h following paw incision (**Fig. 4A,B & C**). The expression of p-Akt/totalAkt in the DRGs was unchanged between both sides in WT and TrkAC groups and between groups (**Fig. 4A & B**). However, the expression of p-p38/totalp38 in the DRGs was significantly increased in the ipsilateral DRGs of WT mice compared to the contralateral side. This increase was not observed in the TrkAC mice such as found at the transcript level of p38 MAPK (**Fig. 4A & C**).

ASIC3, TrkA, CGRP expression in ipsilateral L4-L5-L6 DRGs of WT and TrkAC mice following paw incision

Since increased expression of ASIC3 has been observed following paw incision in rat (Deval *et al.*, 2011), NGF is a regulator of ASIC3 gene expression through TrkA/JNK/p38 MAPK pathway (Mamet, Lazdunski and Voilley, 2003) and, ASIC3 may participate to mechanotransduction phenomenon (Page *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2016), we assessed the expression of ASIC3, TrkA and CGRP in ipsilateral L4-L5-L6 DRGs neurons 48h following plantar incision (**Fig. 5A, B & C**).



Fig 5 : Analysis of ASIC3, TrkA and CGRP expression in sensory neurons of the L4-L5-L6 ipsilateral DRG 48h following plantar incision in WT and TkAC mice. (**A**) From left to right, representative photomicrographs of ASIC3, TrkA and CGRP positive neurons in L4-L5-L6 DRGs of WT (upper panel) and TrkAC (lower panel) mice. Merge image (extreme right) shows ASIC3-positive neurons expressing TrkA and CGRP (arrowhead; scale bar, 200µm). (**B**) Percentage of ASIC3, TrkA or CGRP positive neurons / number of total lumbar DRG neurons in WT and TrkAC mice. (**C**) Percentage of double or triple labeled lumbar DRG neurons / number of total lumbar DRG neurons in WT and TrkAC mice. n=5 for each genotype. Non parametric Mann-Whitney test. * $p \le 0.05$ compared to WT animals.

The representative photomicrographs show from left to right, ASIC3, TrkA, CGRP and merge staining in ipsilateral DRG of WT (upper panel) and TrkAC (below panel) 48h following plantar incision (**Fig. 5A**). Arrows indicate DRG neurons expressing both ASIC3, TrkA and CGRP which is decreased in TrkAC mice compared to WT. The percentage of TrkA and CGRP positive neurons was similar between WT and TrkAC mice following plantar incision (29.8 ± 1.9% and 32.2 ± 3.2 % in WT *vs* 32.7 ± 3.1% and 26.7 ± 1% in TrkAC, respectively, **Fig. 5B**). However, the number of ASIC3 positive neurons was significantly decreased in TrkAC animals compared to WT following plantar incision (70.6 ± 5.5% *vs* 79.9 ± 5.1%, respectively, **Fig. 5B**). Most importantly, this decrease of ASIC3 was found in CGRP (WT: 25.9 ± 4% *vs* TrkAC: 17.1 ± 1.7%) and TrkA/CGRP (WT: 21.1 ± 2.2% *vs* TrkAC: 14.6 ± 1.7%) positive neurons, respectively (**Fig. 5C**).

Visceral pain model

Pain behaviour in WT and TrkAC mice following cyclophosphamide administration

We assessed referred mechanical allodynia using abdominal von Frey test following intraperitoneal administration of CYP or saline in WT and TrkAC animals (**Fig. 6A**). Before CYP injection, 50% mechanical withdrawal thresholds of the abdomen (*i.e.* baseline) were not different between all groups and genotypes (WT and TrkAC). Saline administration did not significantly change mechanical threshold in WT and TrkAC mice, despite a non-significant decrease in TrkAC saline mice. However, following CYP administration, WT animals exhibited severe referred mechanical allodynia from 4h to 48h post-CYP which was characterized by a significant decreased of 50% mechanical threshold compared to WT saline control group (**Fig. 6A**). TrkAC mice treated with CYP also developed significant referred allodynia from 4h to 48h compared to WT saline treated mice, but to a smaller extent than WT CYP, as 50% mechanical threshold was significantly different from WT CYP animals 4h and 24h following CYP administration (**Fig. 6A**).

Cystometry parameters in WT and TrkAC mice following cystitis

Representative recordings of micturition cycle from anaesthetized mice from the different groups are presented in **Fig. 6B**. There was no difference in the micturition reflex between WT and



Fig 6 : Effect of cyclophosphamide induced-cystitis on referred mechanical allodynia (**A**) and bladder cystometry (**B** & C) in WT and TrkAC mice. (**A**) Referred mechanical allodynia was assessed by the application of von Frey hairs on the abdomen using the up and down method before, 4h, 24h and 48h after a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CYP: 150 mg/kg) or saline in WT and TrkAC female mice. (**B**) Representative typical recordings of several micturition cycle in anesthetised WT and TrkAC female mice 48h after injection of saline or CYP. (**C**) Cystometry parameters analysis (intercontraction interval (min), bladder capacity (µl), mean voiding volume (µl): upper panel, from left to right), maximum bladder pressure, contraction threshold, resting pressure, contraction amplitude (table below) in anesthetised female WT and TrkAC mice 48h following injection of saline or CYP. n=5-8 for each group. One-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * p ≤ 0.05 compared to WT or TrkAC animals.

TrkAC saline treated mice which was regular. In contrast, we observed relatively similar increased in the frequency of micturition reflex following CYP administration in both genotypes (Fig. 6B). The intercontraction interval (ICI) of the bladder was not significantly different, despite a slight decrease between WT and TrkAC mice injected with saline (left panel, Fig. 6C). As expected, CYP injection significantly reduced ICI in WT animals showing a significant reduction compared to WT saline mice, suggesting bladder over reactivity. The TrkAC CYP group also exhibited a significant decreased of ICI compared to WT saline group but not TrkAC saline mice (left panel, **Fig. 6C**). The bladder capacity was not significantly different between WT and TrkAC saline groups despite a slight decrease in TrkAC saline mice (middle panel, Fig. 6C). CYP injection significantly reduced bladder capacity in WT CYP animals with a significant reduction compared to WT saline mice. The TrkAC CYP group also exhibited a significant decrease of the bladder capacity compared to WT saline group but not TrkAC saline mice (middle panel, Fig. 6C). Intriguingly, only the mean voiding volume was significantly reduced in TrkAC CYP mice compared to WT saline group (right panel, Fig. 6C). The others groups exhibited a similar mean voiding volume. As expected, any difference in the others parameters (maximum bladder pressure, contraction threshold, resting pressure and contraction amplitude) between genotypes and conditions (saline and CYP) was observed (Table, Fig. 6C).

Bladder histology

Overall, we did not observe any obvious anatomical difference of the bladder between WT and TkAC saline treated mice (**Fig. 7A**). However, the bladder wall appeared thickened in WT CYP treated mice compared to WT saline group and was associated with partial loss of the urothelium (**Fig. 7A**). The remaining urothelial cells in WT CYP treated mice were abnormally large, when compared to WT saline controls (**Fig. 7A**). Furthermore, histological evaluation showed that submucosal layer was enlarged and presented oedema, fibrosis, haemorrhage and inflammatory cells infiltrate. TrkAC CYP mice presented moderate mucosal ulceration, and mild to moderate oedema and haemorrhage compared to WT CYP group but were still significantly damaged compared to TrkAC saline control group (**Fig. 7A**).



Fig 7 : (**A**) Representative photomicrographs of Hematoxyline/Eosine bladder histology and (**B**) CGRP bladder wall staining in female WT and TrkAC mice 48h after injection of saline or CYP (150 mg/kg, i.p.). (**C**) Assessment of the bladder/total mice weight ratio 4h and 48h following injection of saline or CYP (150 mg/kg, i.p.) in female WT and TrkAC mice. Temporal expression profiles of interleukin 6 (IL-6) (**D**) and nerve growth factor (NGF) protein (**E**) in the bladder 4h and 48h following injection of vehicle or CYP in WT and TrkAC mice. Results are shown as the average of IL-6 or NGF content (pg) per milligram of total tissue protein. n=5 per group and time point. One-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * $p \le 0.05$ compared to WT or TrkAC saline treated animals.

CGRP bladder innervation

It has been shown that CGRP staining in the bladder was increased following CYP treatment (Vizzard, 2001; Gonzalez *et al.*, 2015). Therefore, we evaluated peptidergic innervation. It has been shown that CGRP staining in the bladder was increased following CYP treatment (Vizzard, 2001; Gonzalez *et al.*, 2015). Therefore, we evaluated peptidergic innervation. As expected, CGRP staining was significantly increased in WT CYP group compared to WT control group (**Fig. 7B**). However, TrkAC saline mice already presented a significant decrease of CGRP staining, suggesting a loss of fine peripheral peptidergic innervations, especially within the urothelium (**Fig. 7B**). which is in agreement with the loss of epidermal peptidergic innervation observed previously in these mice (Gorokhova *et al.*, 2014). Intriguingly, TrkAC CYP treated mice exhibited a further significant decrease of CGRP staining decrease of CGRP staining in these mice (CGRP staining compared to WT saline control group which could be due to the partial loss of urothelium induced by CYP administration (**Fig. 7B**).

Inflammatory parameters following cystitis in WT and TrkAC mice

The bladder weight/total weight ratio was similar between WT and TrkAC saline control groups at 4h and 48h following saline administration (**Fig. 7C**). CYP injection significantly increased bladder weight in both WT and TrkAC CYP treated group, in a similar manner, at 4h and 48h and 4h, respectively, compared to their respective control groups (**Fig. 7C**).

We also observed a similar increase of IL-6 bladder content only 4h following CYP injection in WT and TrkAC CYP groups compared to their controls groups which reach basal levels 48h after CYP injection (**Fig. 7D**). Similar observation was made for NGF bladder content with a significant increase of NGF bladder content only 4h after CYP administration in WT and TrkAC groups compared to their respective control groups which reach basal levels at 48h (**Fig. 7E**).

Colorectal distension in WT and TrkAC mice

Since we observed a decreased of referred mechanical allodynia in TrkAC mice following cystitis, we sought of interest to assess more directly mechanical visceral response to colonic distension in naïve WT and TrkAC mice. TrkAC mice exhibited a significant decrease in visceromotor response to colonic distension only at the highest volumes (*i.e.* 80 and 100µl) compared to WT mice



Fig 8 : (**A**) Visceromotor response (VMR) to colorectal distension (CRD) in naïve WT and TrkAC mice (left panel, n=8 per group). The area under the curve (AUC) were calculated between 20 μ L and 100 μ L for WT and TkAC mice groups (right panel). (**B**) Evaluation of caecum, spleen and colon weight (g) as well as colon length (cm) over total weight ratio in naïve WT and TrkAC mice (n=4 for each group) (**C**) Representative photomicrographs of CGRP colon wall staining in naïve WT and TrkAC mice. * p ≤ 0.05 compared to WT



Fig 9 : Gene expression profiling of TrkA, TrkC transduction pathways in the lumbar L6-S1 DRGs of WT and TrkAC animals 48h following saline or CYP injection. Relative quantity (RQ) plot of the transcripts differentially expressed in the lumbar DRGs between WT saline or CYP and TrkAC saline or CYP mice assessed by q-PCR. n=4-6 for each group. Non parametric Mann-Whitney test.

(**Fig. 8A**). The area under the curve (AUC) between 20 to 100µL also showed a significant decrease of the colonic mechanical sensitivity in TrkAC mice compared to WT mice (**Fig. 8A**).

As shown in **Figure 8B** (from left to right), caecum, spleen and colon weight and length were not different between WT and TrkAC mice indicating a lack of gross anatomical developmental deficit of the gastrointestinal tract and the spleen. We also investigated CGRP positive peptidergic innervation in the colon of WT and TrkAC mice (**Fig. 8C**). We observed a reduction in CGRP positive fibres in TrkAC mice compared to WT mice (**Fig. 8C**), indicating a decrease of CGRP positive peptidergic fibres of the colon of TrkAC mice, such as observed in the bladder of TrkAC mice. Taken together these results suggest that TrkAC mice exhibited a decrease of mostly peptidergic free nerve endings compared to WT animals in visceral tissues as we previously described in the thick and thin glabrous skin (Gorokhova *et al.*, 2014).

Quantitative PCR of some NGF/TrkA signalling pathways in DRG following cyclophosphamide administration in WT and TrkAC mice

Forty eight hours following CYP administration by contrast to the plantar incision model, we did not observed any significant changes of Akt1, MAPK14 (*i.e.* P38 MAPK) and JUN mRNAs expression in the lumbar DRGs of WT CYP animals compared to the WT control (**Fig. 9**). The results were similar for the TrkAC mice with no significant increase in TrkAC CYP mice compared to TrkAC control mice (**Fig. 9**). The expression levels of the others factors investigated (ERK5, TRPV1, Piezo 2 and CHRNA3) were not different between the WT CYP and WT control mice and TrkAC CYP and TrkAC control mice as well as between the two genotypes (**Fig. 9**).

ASIC3, TrkA, CGRP expression in L6 DRG in WT and TrkAC mice following cystitis

Since increased expression of ASIC3 has been observed following paw incision, we assessed its expression along with CGRP and TrkA in L6 DRG neurons which is one of the DRG largely innervating the bladder (Vizzard, 2001). Representative photomicrographs (**Fig. 10A**) showed an increase of the number of CGRP positive DRGs neurons specifically innervating the bladder only in WT CYP mice. Importantly, ASIC3/CGRP and ASIC3/TrkA/CGRP bladder coexpressing neurons are only increased in WT CYP mice but not in TrkAC CYP mice (**Fig. 10B**). The average percentage of



Fig 10: Analysis of ASIC3, CGRP and TrkA expression in sensory neurons of the L6 DRG innervating the bladder 48h following saline or CYP injection in WT and TrkAC mice. (**A**) From left to right, representative photomicrographs of fluorogold-positive neurons retrogradely labelled from the bladder wall (blue), ASIC3 (green), TrkA (red) and CGRP (grey) positive neurons in L6 DRGs, from top to bottom, of WT saline, WT + CYP, TrkAC saline and TrkAC + CYP mice. Merge image (right) shows ASIC3-positive neurons expressing or not expressing TrkA and CGRP (scale bar, 200µm). (**B**) Percentage of fluorogold positive neurons expressing ASIC3, TrkA and CGRP in WT and TrkAC mice 48h following saline or CYP. (**C**) Percentage of double or triple labelled fluorogold positive neurons of L6 DRG in WT and TrkAC mice. Results are expressed as a percentage of fluorogold positive neurons. n=5 for each genotype and group (*i.e.* saline or CYP). Non parametric Mann-Whitney test. * p ≤ 0.05 compared to WT saline treated animals.

fluorogold positive neurons innervating the bladder in L6 DRG was around 34% of the total number of DRG neurons (Fig. 10B) which is comparable to what has been reported previously(Vizzard, Erdman and de Groat, 1995; Vizzard, 2001). This percentage was similar between WT and TrkAC mice $(34 \pm 2\%$ and $35 \pm 1\%)$ and stayed unchanged following CYP administration as expected $(32.7 \pm 2\%)$ and 32 ± 1.6% for WT CYP and TrkAC CYP, respectively). Among fluorogold positive neurons (i.e. bladder innervating neurons) a vast majority, more than 85%, expressed ASIC3 channels (Fig. 10B), which is similar to what has been reported previously (Hughes et al., 2007). This global expression of ASIC3 was similar between WT and TrkAC mice injected with saline and unchanged following CYP administration in WT and TrkAC mice. Also in fluorogold positive neurons, around 40% of bladder neurons expressed TrkA (Fig. 10B). This expression of TrkA was similar between WT and TrkAC saline mice and stayed unchanged following CYP administration. The percentage of bladder neurons expressing CGRP was not different between WT and TrkA saline control groups (Fig. 10B). However, we observed a significant increase of the number of CGRP positive bladder neurons in WT CYP mice compared to WT saline control group ($50.5 \pm 3\%$ vs $40.5 \pm 2.1\%$, respectively, Fig. 10B). We did not find such an increase in the TrkAC CYP group compared to TrkAC saline control group ($40.8 \pm 6.5\%$ $vs 42.1 \pm 6\%$, respectively, Fig. 10B).

This change was even more striking for the percentage of bladder neurons expressing both ASIC3 and CGRP in WT CYP group (**Fig. 10C**). We observed a significant increase of ASIC3/CGRP positive bladder neurons in WT CYP group compared to WT saline control group ($41.9 \pm 3\%$ vs $28.7 \pm 1.2\%$, respectively, **Fig. 10C**). There was no increase of this type of neurons in the TrkAC CYP group compared to TrkAC saline control group ($32.4 \pm 4.2\%$ vs $32 \pm 2.1\%$, respectively, **Fig. 10C**) which is also not different from WT saline group. The number of TrkA/CGRP double positive bladder neurons was similar between WT and TrkAC saline mice and was not modified following CYP administration (**Fig. 10C**). However, we found a significant increase of the number of ASIC3/TrkA/CGRP triple positive bladder neurons in the WT CYP group compared to WT saline control group ($30.4 \pm 6\%$ vs $22.6 \pm 2.8\%$, respectively, **Fig. 10C**). There was not such increase of this type of neurons in the TrkAC CYP group compared to TrkAC saline control group ($21.3 \pm 2.1\%$ vs $22.7 \pm 1.9\%$, respectively, **Fig. 10C**) which is also not different from WT saline group.

Discussion

Here, we have confirmed and extended the specific lack of mechanical hypersensitivity development in mice expressing a chimeric TrkAC receptor following somatic and, to a lesser extent, visceral injuries while thermal hyperalgesia development is unaffected. This specific loss of mechanical hypersensitivity development in TrkAC mice was not associated with changes in different inflammatory parameters, peripheral NGF released, and retrograde transport of NGF/TrkA complex toward the DRG. Only a deficit of fine peripheral innervation, mostly peptidergic, in visceral and somatic tissues was observed, which cannot explain by its own this mechanical hypersensitivity deficit. Indeed, basal mechanical and thermal thresholds are normal, thermal hyperalgesia, which is mainly mediated by TRPV1 positive peptidergic fibres, was not impaired and both TrkAC and WT mice exhibited similar pain behaviour after intraplantar capsaicin. However, alterations in the expression/function of mainly two TrkA intracellular pathways (p38 MAPK and c-Jun) in TrkAC mice DRGs following plantar incision but not CYP administration, were observed which ultimately lead to a reduction of ASIC3 channel expression in TrkA positive-peptidergic fibres in both models. Taken together, these results suggest that these two specific TrkA intracellular pathways, especially p38 MAPK, are essentials for the development of mechanical allodynia at least following somatic injury and that ASIC3 could be a crucial player in both somatic and visceral pain conditions mediated by NGF/TrkA.

TrkAC mice present a specific and profound deficit in mechanical hypersensitivity development after plantar incision and systemic NGF injection. Following CYP induced-cystitis, TrkAC mice only exhibited a slight but significant reduction of referred mechanical hypersensitivity compared to WT animals. In contrast, cystometric parameters (*i.e.* inter-contraction interval and bladder capacity) were similarly decreased in both genotypes following CYP administration as described previously in WT mice (Studeny *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Moreover, colonic mechanical sensitivity assessed by colorectal distension was impaired only with high distension volumes in TrkAC mice compared to WT mice. Modification in the development of peripheral inflammation cannot explain the mechanical hypersensitivity deficit in TrkAC mice. Similar increase of oedema (paw thickness and bladder weight ratio), bladder histological damage,

IL-6 content in the bladder and the skin, NGF content in the bladder, and NGF/TrkA complex trafficking, following somatic or visceral injuries was observed between TrkAC and WT mice. Comparable increase in these different parameters has been described in these two different pain models (Banik et al., 2005; Guerios, Wang and Bjorling, 2006; Sahbaie et al., 2009; Coelho et al., 2015). However, a decrease in the density of CGRP-positive fibres in the bladder and the colon of TrkAC mice, as well as an absence of an increase of CGRP bladder staining following CYP in TrkAC mice compared to WT was observed, suggesting a specific reduction in peripheral fine, mostly peptidergic, innervation in visceral tissues. Thus, TrkAC mice present specific developmental target innervations defects of peripheral, mostly peptidergic, terminal branches in visceral tissues such as the somatic tissues, well known to be highly dependent on NGF (Lewin, Lechner and Smith, 2014; Mizumura and Murase, 2015; Denk, Bennett and McMahon, 2017). Therefore, an obvious explanation for the specific loss of mechanical hypersensitivity exhibited by TrkAC mice could be this peripheral innervation defect. However, peptidergic fibres, mainly expressing TRPV1, are essential for behaviours evoked by noxious heat, but are dispensable for mechanically-evoked behaviours (Cavanaugh et al., 2009a). Thermal hyperalgesia, which is mainly conveyed by peptidergic positive fibres mostly expressing TRPV1 and, in a large proportion TrkA (Caterina et al., 2000; Cavanaugh et al., 2009), was totally preserved in TrkAC mice at baseline and following plantar incision or systemic NGF administration. Indeed, NGF-induced heat hyperalgesia is largely dependent on the presence of TRPV1 since it is absent in TRPV1 knock-out mice or after TRPV1 blockade (Caterina et al., 2000). One may argue that TrkAC mice could rather display a functional deficit of TRPV1. However, basal TRPV1 expression in lumbar DRG is unaltered in TrkAC mice (here and (Gorokhova et al., 2014)), and they exhibit similar nocifensive behavioural response to intraplantar capsaicin compared to WT mice. Finally, despite significant reductions in the density of epidermal neuritis including peptidergic fibres, a mutated mice lacking p75^{NTR}, the pan receptor of neurotrophins, still develop mechanical and thermal hyperalgesia after systemic NGF delivery while they exhibited a decrease in basal mechanical and thermal thresholds (Bergmann et al., 1997, 1998). By contrast, TrkAC mice did not display any change in basal mechanical and thermal thresholds despite reduction in the density of epidermal and visceral neuritis but only a specific loss of mechanical hypersensitivity development following somatic and, to a lesser

extent, visceral injuries. Therefore, this marked decrease in peripheral innervation cannot explain by its own the lack of mechanical hypersensitivity development in TrkAC mice, especially following somatic injury. Moreover, we have previously shown that the expression of some types of important peripheral mechanosensory fibres (TrkB and early Ret positive fibres) were unaffected in TrkAC mice.

Thus, another possibility is that the remaining primary afferents fibres present a functional deficit due to the absence of TrkA specific pathways which has been replaced by the TrkC pathways explaining the lack of mechanical hypersensitivity. By contrast, increased activation of TrkC specific pathways and/or TrkA and TrkC intracellular pathways largely overlap, to ultimately mediate thermal hyperalgesia. Consequently, we assessed the mRNA expression of several common and specific TrkA/TrkC intracellular transduction pathways in ipsilateral and contralateral DRGs 48h after plantar incision in WT and TrkAC mice. First, the basal mRNA expression of all the pathways investigated were similar between both genotypes suggesting that TrkC intracellular expression instead of TrkA did not modified significantly the overall signalling of DRG cells in basal conditions. However, in pathological conditions, there is a marked decrease of the up-regulation of Akt, p38 MAPK and c-Jun mRNA expression in the ipsilateral DRGs of TrkAC mice compared to WT. Importantly, at the protein level, we demonstrated an absence of increased phosphorylation of p38 MAPK in TrkAC mice compared to WT. The expression of the others pathways investigated (ERK1, ERK2, ERK5, PKMzeta, PKA and PKC) remained unaffected following plantar incision, therefore not different between genotypes. Interestingly, the mRNA expression of Akt, p38MAPK, c-Jun and ERK5 was not modified following CYP in WT mice as well as TrkAC mice, suggesting that these pathways are mainly involved in the development of somatic mechanical hypersensitivity.

These changes of some pathways, especially p38 MAPK, between WT and TrkAC animals may be due to few proteins, which bind differentially to the intracellular domains of the two receptors, TrkA and TrkC, such as GIPC1 (Kato *et al.*, 2004), Grit (Nakamura *et al.*, 2002) and Nedd4L (Mortimer *et al.*, 2010), leading to the modulation of distinct downstream pathways such as Akt, p38 MAPK and c-Jun for instance, at least following somatic injury. Alternatively, structural differences between TrkA and TrkAC receptors could lead to different activation levels of downstream effectors. Previous *in vitro* studies have demonstrated that while both TrkA and TrkC receptors activated ERK and Akt pathways, they did so to a different extent, leading to distinct effects on axonal morphology (Markus, Zhong and Snider, 2002). Overall, changes of intracellular pathways and subsequent genes expression in the DRG seem essential for the development of mechanical hypersensitivity induced by NGF while thermal hyperalgesia could be mainly due to peripheral sensitisation of TRPV1 in the primary afferent terminals.

The expression/function of the mechanostransducer(s) involved in the development of mechanical hypersensitivity at the periphery is largely dependent on NGF (Di Castro et al., 2006). ASIC3, a proton gated channel, might be among the contributors of this mechanotransduction phenomena, the regulation of its expression being regulated by NGF and particularly TrkA transduction pathways (Mamet, Lazdunski and Voilley, 2003). Moreover, it has been involved in mechanical hypersensitivity in several types of pain models (Deval et al., 2011; Walder et al., 2010; Rudan et al., 2015). Interestingly, we found a decrease in the up regulation of ASIC3 expression in TrkA-positive peptidergic DRGs neurons in TrkAC mice following both somatic and intriguingly, visceral injuries. Of note, we did not observed any changes in Piezo 2 expression in both models and CHRNA3 in CYP animals. CHRNA3 has been recently proposed as a specific marker of peptidergic mechanoinsensitive silent neurons which specifically contribute to NGF-dependent mechanical hyperalgesia following inflammation in visceral organs, muscles and joints (Prato et al., 2017). Thus, this decrease of ASIC3 expression could partially explain the lack of mechanical hypersensitivity development in TrkAC mice. The prevalence of ASIC3 in neurons innervating the viscera as well as electrophysiological data supports an important contribution of ASIC3 to visceromechanosensitivity (Jones, Xu and Gebhart, 2005; Page et al., 2005; Hughes et al., 2007) but, these studies also highlight a role of TRPV1 peptidergic fibers, contrasting to they're lack of involvement in somatic mechanosensitivity (Hwang, Oh and Valtschanoff, 2005; Jones, Xu and Gebhart, 2005; Cavanaugh et al., 2009). This differential role of TRPV1 could explain the only partial decrease of mechanical hypersensitivity observed in CYP TrkAC mice since TRPV1 function seems unaffected in TrkAC mice. Finally, Mamet et al., demonstrated that ASIC3 overexpression by NGF in inflammation like states is dependent on the cooperation of at least JNK (c-Jun)/p38 MAPK pathways (Mamet, Lazdunski and Voilley, 2003). Strikingly, we observed a decrease expression of these two specific pathways in the DRG of TrkAC mice associated to a decrease expression of ASIC3, which could ultimately lead to mechanical hypersensitivity deficit in chronic pain states especially following somatic injuries.

Here, we have demonstrated a specific and profound deficit of mechanical hypersensitivity in TrkAC mice following somatic injuries and to a lesser extent, visceral injury. This deficit does not seem to be due to the peripheral innervation defect in the skin and visceral tissues of these mice but rather the alteration in TrkA specific transduction pathways. Indeed, alterations in the expression of different transduction pathways especially p38 MAPK, were observed, which could ultimately lead to mechanical hypersensitivity deficiency through a decrease of ASIC3 expression, especially after somatic injury. Further studies are needed to better clarify the differential role of the specific TrkA transduction pathways in mechanical and thermal pain where the TrkAC mice could be a very valuable tool.
Bibliography

Andersson, K.-E., Soler, R. and Füllhase, C. (2011) 'Rodent models for urodynamic investigation', *Neurourology and Urodynamics*, 30(5), pp. 636–646. doi: 10.1002/nau.21108.

Banik, R. K., Subieta, A. R., Wu, C. and Brennan, T. J. (2005) 'Increased nerve growth factor after rat plantar incision contributes to guarding behavior and heat hyperalgesia', *Pain*, 117(1–2), pp. 68–76. doi: 10.1016/j.pain.2005.05.017.

Bannwarth, B. and Kostine, M. (2017) 'Nerve Growth Factor Antagonists: Is the Future of Monoclonal Antibodies Becoming Clearer?', *Drugs*. doi: 10.1007/s40265-017-0781-6.

Bergmann, I., Priestley, J. V., McMahon, S. B., Bröcker, E. B., Toyka, K. V. and Koltzenburg, M. (1997) 'Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75', *The European Journal of Neuroscience*, 9(1), pp. 18–28.

Bergmann, I., Reiter, R., Toyka, K. V and Koltzenburg, M. (1998) 'Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75.', *Neuroscience letters*, 255(2), pp. 87–90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835221 (Accessed: 28 June 2018).

Brennan, T. J., Vandermeulen, E. P. and Gebhart, G. F. (1996) 'Characterization of a rat model of incisional pain', *Pain*, 64(3), pp. 493–501.

Di Castro, A., Drew, L. J., Wood, J. N. and Cesare, P. (2006) 'Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(12), pp. 4699–704. doi: 10.1073/pnas.0508005103.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I. and Julius, D. (2000) 'Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.', *Science (New York, N.Y.)*, 288(5464), pp. 306–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764638 (Accessed: 17 September 2018).

Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I. and Anderson, D. J. (2009a) 'Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(22), pp. 9075–80. doi: 10.1073/pnas.0901507106.

Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I. and Anderson, D. J. (2009b) 'Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), pp. 9075–80. doi: 10.1073/pnas.0901507106.

Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. and Yaksh, T. L. (1994) 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw', *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

Christianson, J. A. and Gebhart, G. F. (2007) 'Assessment of colon sensitivity by luminal distension in mice', *Nature Protocols*, 2(10), pp. 2624–2631. doi: 10.1038/nprot.2007.392.

Coelho, A., Wolf-Johnston, A. S., Shinde, S., Cruz, C. D., Cruz, F., Avelino, A. and Birder, L. A. (2015) 'Urinary bladder inflammation induces changes in urothelial nerve growth factor and TRPV1 channels', *British Journal of Pharmacology*, 172(7), pp. 1691–1699. doi: 10.1111/bph.12958.

Denk, F., Bennett, D. L. and McMahon, S. B. (2017) 'Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms', *Annual Review of Neuroscience*. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031121.

Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M. and Lingueglia, E. (2011) 'Acid-sensing ion channels in postoperative pain', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(16), pp. 6059–6066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5266-10.2011.

Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M. and Lingueglia, E. (2008) 'ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain', *The EMBO Journal*, 27(22), pp. 3047–3055. doi: 10.1038/emboj.2008.213.

Dixon, W. J. (1980) 'Efficient Analysis of Experimental Observations', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20(1), pp. 441–462. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.

Evans, R. J., Moldwin, R. M., Cossons, N., Darekar, A., Mills, I. W. and Scholfield, D. (2011) 'Proof of concept trial of tanezumab for the treatment of symptoms associated with interstitial cystitis.', *The Journal of urology*, 185(5), pp. 1716–21. doi: 10.1016/j.juro.2010.12.088.

Gonzalez, E. J., Peterson, A., Malley, S., Daniel, M., Lambert, D., Kosofsky, M. and Vizzard, M. A. (2015) 'The effects of tempol on cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat micturition reflexes', *TheScientificWorldJournal*, 2015, p. 545048. doi: 10.1155/2015/545048.

Gorokhova, S., Gaillard, S., Urien, L., Malapert, P., Legha, W., Baronian, G., Desvignes, J.-P., Alonso, S. and Moqrich, A. (2014) 'Uncoupling of molecular maturation from peripheral target innervation in nociceptors expressing a chimeric TrkA/TrkC receptor.', *PLoS genetics*. Public Library of Science, 10(2), p. e1004081. doi: 10.1371/journal.pgen.1004081.

Guerios, S. D., Wang, Z.-Y. and Bjorling, D. E. (2006) 'Nerve growth factor mediates peripheral mechanical hypersensitivity that accompanies experimental cystitis in mice', *Neuroscience Letters*, 392(3), pp. 193–197. doi: 10.1016/j.neulet.2005.09.026.

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. and Joris, J. (1988) 'A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia', *Pain*, 32(1), pp. 77–88.

Hochberg, M. C. (2015) 'Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of antinerve growth factor monoclonal antibodies.', *Osteoarthritis and cartilage*, 23 Suppl 1, pp. S18-21. doi: 10.1016/j.joca.2014.10.005.

Hughes, P. A., Brierley, S. M., Young, R. L. and Blackshaw, L. A. (2007) 'Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia', *The Journal of Comparative Neurology*, 500(5), pp. 863–875. doi: 10.1002/cne.21204.

Hwang, S. J., Oh, J. M. and Valtschanoff, J. G. (2005) 'Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents', *Brain Research*, 1047(2), pp. 261–266. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.036.

Jones, R. C. W., Xu, L. and Gebhart, G. F. (2005) 'The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(47), pp. 10981–10989. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0703-05.2005.

Kato, H., Ohno, K., Hashimoto, K. and Sato, K. (2004) 'Synectin in the nervous system: expression pattern and potential as a binding partner of neurotrophin receptors', *FEBS letters*, 572(1–3), pp. 123–128. doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.017.

Kerr, B. J., Souslova, V., McMahon, S. B. and Wood, J. N. (2001) 'A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain.', *Neuroreport*, 12(14), pp. 3077–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568640 (Accessed: 7 August 2018).

Klesse, L. J. and Parada, L. F. (1999) 'Trks: signal transduction and intracellular pathways', *Microscopy Research and Technique*, 45(4–5), pp. 210–216. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<210::AID-JEMT4>3.0.CO;2-F.

Lai, H. H., Shen, B., Vijairania, P., Zhang, X., Vogt, S. K. and Gereau, R. W. (2017) 'Anti-vascular endothelial growth factor treatment decreases bladder pain in cyclophosphamide cystitis: a Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network animal model study', *BJU international*. doi: 10.1111/bju.13924.

Lane, N. E., Schnitzer, T. J., Birbara, C. A., Mokhtarani, M., Shelton, D. L., Smith, M. D. and Brown, M. T. (2010) 'Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 363(16), pp. 1521–1531. doi: 10.1056/NEJMoa0901510.

Leite, V. F., Buehler, A. M., El Abd, O., Benyamin, R. M., Pimentel, D. C., Chen, J., Hsing, W. T., Mazloomdoost, D. and Amadera, J. E. D. (2014) 'Anti-nerve growth factor in the treatment of low back pain and radiculopathy: a systematic review and a meta-analysis', *Pain Physician*, 17(1), pp. E45-60.

Lewin, G. R., Lechner, S. G. and Smith, E. S. J. (2014) 'Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy.', *Handbook of experimental pharmacology*, 220, pp. 251–82. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_10.

Lewin, G. R., Ritter, A. M. and Mendell, L. M. (1993) 'Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(5), pp. 2136–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478693 (Accessed: 1 August 2017).

Lin, S.-H., Cheng, Y.-R., Banks, R. W., Min, M.-Y., Bewick, G. S. and Chen, C.-C. (2016) 'Evidence for the involvement of ASIC3 in sensory mechanotransduction in proprioceptors', *Nature Communications*, 7, p. 11460. doi: 10.1038/ncomms11460.

Mamet, J., Lazdunski, M. and Voilley, N. (2003) 'How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons.', *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp. 48907–13. doi: 10.1074/jbc.M309468200.

Markus, A., Zhong, J. and Snider, W. D. (2002) 'Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth', *Neuron*, 35(1), pp. 65–76.

Miller, R. E., Block, J. A. and Malfait, A.-M. (2017) 'Nerve growth factor blockade for the management

of osteoarthritis pain: what can we learn from clinical trials and preclinical models?', *Current opinion in rheumatology*. NIH Public Access, 29(1), pp. 110–118. doi: 10.1097/BOR.00000000000354.

Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Dérijard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L. and Karin, M. (1994) 'Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK', *Science (New York, N.Y.)*, 266(5191), pp. 1719–1723.

Mizumura, K. and Murase, S. (2015) 'Role of Nerve Growth Factor in Pain', in *Handbook of experimental pharmacology*, pp. 57–77. doi: 10.1007/978-3-662-46450-2_4.

Mortimer, D., Pujic, Z., Vaughan, T., Thompson, A. W., Feldner, J., Vetter, I. and Goodhill, G. J. (2010) 'Axon guidance by growth-rate modulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), pp. 5202–5207. doi: 10.1073/pnas.0909254107.

Nakamura, T., Komiya, M., Sone, K., Hirose, E., Gotoh, N., Morii, H., Ohta, Y. and Mori, N. (2002) 'Grit, a GTPase-activating protein for the Rho family, regulates neurite extension through association with the TrkA receptor and N-Shc and CrkL/Crk adapter molecules', *Molecular and Cellular Biology*, 22(24), pp. 8721–8734.

Nickel, J. C., Mills, I. W., Crook, T. J., Jorga, A., Smith, M. D., Atkinson, G. and Krieger, J. N. (2016) 'Tanezumab Reduces Pain in Women with Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome and Patients with Nonurological Associated Somatic Syndromes', *The Journal of Urology*, 195(4 Pt 1), pp. 942–948. doi: 10.1016/j.juro.2015.10.178.

O'Brien, D. E., Brenner, D. S., Gutmann, D. H. and Gereau, R. W. (2013) 'Assessment of pain and itch behavior in a mouse model of neurofibromatosis type 1', *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 14(6), pp. 628–637. doi: 10.1016/j.jpain.2013.01.770.

Page, A. J., Brierley, S. M., Martin, C. M., Price, M. P., Symonds, E., Butler, R., Wemmie, J. A. and Blackshaw, L. A. (2005) 'Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function', *Gut*, 54(10), pp. 1408–1415. doi: 10.1136/gut.2005.071084.

Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. (2001) 'Trk receptors: mediators of neurotrophin action', *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), pp. 272–280.

Prato, V., Taberner, F. J., Hockley, J. R. F., Callejo, G., Arcourt, A., Tazir, B., Hammer, L., Schad, P., Heppenstall, P. A., Smith, E. S. and Lechner, S. G. (2017) 'Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive "Silent" Nociceptors', *Cell Reports*, 21(11), pp. 3102–3115. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.066.

Rice, A. S. C., Cimino-Brown, D., Eisenach, J. C., Kontinen, V. K., Lacroix-Fralish, M. L., Machin, I., Mogil, J. S. and 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), pp. 243–247. doi: 10.1016/j.pain.2008.08.017.

Rudan, I., Sidhu, S., Papana, A., Meng, S.-J., Xin-Wei, Y., Wang, W., Campbell-Page, R. M., Demaio, A. R., Nair, H., Sridhar, D., Theodoratou, E., Dowman, B., Adeloye, D., Majeed, A., Car, J., Campbell, H., Wang, W., Chan, K. Y. and Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG), G. H. E. R. G. (2015) 'Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis.', *Journal of global health*. Edinburgh University Global Health Society, 5(1), p.

010409. doi: 10.7189/jogh.05.010409.

Sahbaie, P., Shi, X., Guo, T.-Z., Qiao, Y., Yeomans, D. C., Kingery, W. S. and Clark, J. D. (2009) 'Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision', *Pain*, 145(3), pp. 341–349. doi: 10.1016/j.pain.2009.06.037.

Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-No, K., Sakurada, S. and Kisara, K. (1992) 'The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord', *Neuropharmacology*, 31(12), pp. 1279–1285.

Silva, R. B. M., Sperotto, N. D. M., Andrade, E. L., Pereira, T. C. B., Leite, C. E., de Souza, A. H., Bogo, M. R., Morrone, F. B., Gomez, M. V. and Campos, M. M. (2015) 'Spinal blockage of P/Q- or N-type voltage-gated calcium channels modulates functional and symptomatic changes related to haemorrhagic cystitis in mice', *British Journal of Pharmacology*, 172(3), pp. 924–939. doi: 10.1111/bph.12966.

Studeny, S., Cheppudira, B. P., Meyers, S., Balestreire, E. M., Apodaca, G., Birder, L. A., Braas, K. M., Waschek, J. A., May, V. and Vizzard, M. A. (2008) 'Urinary bladder function and somatic sensitivity in vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-/- mice', *Journal of molecular neuroscience: MN*, 36(1–3), pp. 175–187. doi: 10.1007/s12031-008-9100-8.

Vizzard, M. A. (2001) 'Alterations in neuropeptide expression in lumbosacral bladder pathways following chronic cystitis', *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 21(2), pp. 125–138.

Vizzard, M. A., Erdman, S. L. and de Groat, W. C. (1995) 'Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(5 Pt 2), pp. 4033–4045.

Walder, R. Y., Rasmussen, L. A., Rainier, J. D., Light, A. R., Wemmie, J. A. and Sluka, K. A. (2010) 'ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia Following Inflammatory Muscle Injury', *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 11(3), pp. 210–218. doi: 10.1016/j.jpain.2009.07.004.

Wang, H.-J., Lee, W.-C., Tyagi, P., Huang, C.-C. and Chuang, Y.-C. (2017) 'Effects of low energy shock wave therapy on inflammatory moleculars, bladder pain, and bladder function in a rat cystitis model', *Neurourology and Urodynamics*, 36(6), pp. 1440–1447. doi: 10.1002/nau.23141.

Xing, J., Kornhauser, J. M., Xia, Z., Thiele, E. A. and Greenberg, M. E. (1998) 'Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation', *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), pp. 1946–1955.

York, R. D., Molliver, D. C., Grewal, S. S., Stenberg, P. E., McCleskey, E. W. and Stork, P. J. (2000) 'Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1', *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), pp. 8069–8083.

Zimmermann, M. (1983) 'Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals', *Pain*, 16(2), pp. 109–110.

Résultats expérimentaux - Article n° l

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, Conseil Régional Auvergne-Rhône-Alpes (project Ressourcement S3, Arth-Innov) and Feder.



Supplementary Fig 1: Representative photomicrographs of nonpeptidergic (IB4-positive, green) and peptidergic (CGRP-positive, red) positive fibres in the lumbar spinal cord in WT and TrkAC mice. Both types of fibres normally innervate adult spinal cord in TrkAC compared to WT mice (scale bar, 200µm).

3. Présentation de l'Article 2

Comme développé en introduction, les anti-NGF ont montré une bonne efficacité quant à la diminution des symptômes douloureux associés à des pathologiques articulaires comme l'arthrose (Lane *et al.*, 2010). Malheureusement, les effets indésirables induits suite à cette immunothérapie et notamment au niveau osseux posent question du blocage d'un facteur aussi pléiotropique que le NGF.

C'est pourquoi, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle du NGF via l'activation de son récepteur de haute affinité TrkA dans les altérations physiopathologiques et les symptômes douloureux dans un modèle de douleur articulaire inflammatoire de monoarthrite induite par l'Adjuvant Complet de Freund (CFA).

Pour cela, nous avons choisi une stratégie génétique en utilisant des souris génétiquement modifiées TrkA/C (modèle développé en avant-propos Article 1 : I. 1.1) qui exprime un récepteur chimérique TrkA/TrkC au lieu du récepteur TrkA et réalisé une étude multimodale *in vivo* dans un modèle de monoarthrite induite au CFA.

Les résultats de cette étude démontrent, qu'outre le rôle clé du NGF *via* TrkA dans l'hypersensibilité mécanique en contexte de douleur inflammatoire articulaire, une fonction essentielle des voies de signalisation NGF/TrkA au niveau du remodelage osseux associé à une arthrite et plus précisément dans l'activation ostéoclastique et la résoption osseuse. Nous suggérons que la diminution de l'hyperalgie mécanique observée dans cette étude est due à la diminution de la néoinnervation des fibres CGRP en contexte d'arthrite associé à la diminution de l'expression de certains neurotransmetteurs ainsi qu'une diminution de mécanotransducteurs putatifs, notamment TRAAK et ASIC3. Il semblerait que la voie de signalisation c-Jun soit potentiellement impliquée dans ce déficit d'hypersensibilité mécanique et peut être, dans le remodelage osseux induit par le NGF en condition inflammatoire. Enfin, nous ne pouvons exclure un rôle indirect de cette diminution du remodelage osseux dans la diminution de l'hypersensibilité mécanique.

Article n°2

Specific TrkA signalling pathways are essential for mechanical hypersensitivity development and bone remodelling in arthritis using knock-in TrkA/C mice

Delay L¹, Barbier J¹, Boudieu L¹, Aissouni Y¹, Ardid D¹, Briat A², Auzeloux P², Miot-Noirault E² Mogrich A³, Marchand F^{1†}

1. Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 NEURO-DOL, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

2. UMR 1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques (IMoST), Clermont-Ferrand, France

3. Institut de Biologie du Développement de Marseille Luminy, UMR 6216 CNRS-Université de la Méditerranée, Campus de Luminy case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France.

<u>Corresponding author</u>: Fabien Marchand. Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 NEURO-DOL, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000
Clermont-Ferrand Cedex 01, France.

Tel: +33 473178230; Fax: +33 473274621. Email address: <u>fabien.marchand@uca.fr</u>

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease very commonly associated with chronic pain which is often resistant to currents analgesics. Targeting Nerve Growth Factor (NGF) is very effective to reduce pain in several painful conditions but lead to some potentially serious adverse effects. Our aim was to better understand the involvement of the specific intracellular signalling pathways activated by NGF through its specific tyrosine kinase type A (TrkA) receptor, in the pathophysiology of RA especially those involved in joint metabolism and associated chronic pain. We performed a multimodal study in knock-in TrkA/C mice expressing a chimeric receptor formed by the native extracellular part of TrkA and the functional transmembrane and intracellular parts of the tyrosine kinase type C receptor (TrkC) (i.e. neurotrophin 3 receptor). We investigated nociceptive behaviours such as mechanical allodynia and thermal hyperalgesia using von Frey and paw immersion test in the Complete Freund Adjuvant (CFA) induced-arthritis mice model. In vivo cartilage and bone remodelling were assessed by scintigraphic imaging using 99mTc-NTP 15-5 and 99mTc-HMDP radiotracers, respectively, and bone resorption by cathepsin K fluorescent imaging. Expression of CD68 positive cells and CGRP positive nerve fibres sprouting were evaluated in the joint by immunostaining. Finally, changes in the transcriptome within the DRGs were investigated by RNA sequencing. We have demonstrated that TrkA/C mice exhibited a specific decrease in mechanical allodynia, correlated with a reduction of CGRP+ peptidergic fibres innervation sprouting compared to wild-type mice. In addition, we only observed a significant decrease in bone remodelling/erosion in TrkA/C mice as well as a reduction in CD68⁺ cell infiltration with no changes in joint inflammation. Finally, several changes of the mRNA expression of putative mechanotransducers such as ASIC3 and TRAAK as well as intracellular pathways such as c-Jun were observed, which could partially explain TrkA/C particular phenotype following arthritis. TrkA/C mice seem to be a very useful tool to decipher the specific intracellular pathways involved in mechanical hypersensitivity and bone remodelling in an arthritis context.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterised by joint inflammation, cartilage damage and bone erosion commonly associated with chronic pain, the most common incapacitating symptom (Heiberg and Kvien, 2002). Faced with the complex aetiology of RA, there are currently no curative treatments. In a relatively large proportion of patient, the present "Treat to Target" therapeutic strategy, corresponding to conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), prescribed alone or in combination with biologic agents, fails to be effective. Moreover, a significant amount of patients complain from persistent pain (Lee *et al.*, 2011; Altawil *et al.*, 2016), with more than 60% unsatisfied by their pain management (Taylor *et al.*, 2010). Therefore, innovative therapeutic strategies especially targeting pain symptoms in RA, are definitely needed (Bannwarth and Kostine, 2014; Calabrò *et al.*, 2016).

Nerve growth factor (NGF) is a critical neurotrophin for the growth and survival of sensory and sympathetic nerve fibres during development (Levi-Montalcini, 1987). In adulthood, it plays a key role in neuronal plasticity and dynamically regulates inflammatory pain processes (Bennett *et al.*, 1998). NGF, exerts its biological effects by binding to the type A tyrosine kinase receptor (TrkA) with high affinity and to the pan-neurotrophin receptor p75^{NTR} with low affinity. Binding of mature NGF on TrkA leads to its dimerization, auto-phosphorylation and activation of several downstream intracellular signalling pathways such as Mitogen Activated Protein Kinase (Ras/Raf/Erk), PLCγ/PKC and/or Pl₃K/Akt (Obermeier *et al.*, 1993; Miller and Kaplan, 2001; Chao, 2003).

Patients with established RA present an increase of NGF and TrkA expression in the synovial fluid and tissue of inflamed joints (Aloe *et al.*, 1992; Barthel *et al.*, 2009; Raychaudhuri *et al.*, 2011b). NGF blockers dose-dependently reduced pain and improved physical function in osteoarthritis and low back pain patients (Lane *et al.*, 2010b; Katz *et al.*, 2011). However, neurologic adverse events and accelerated arthropathies have been unfortunately reported in clinical trials (Lane *et al.*, 2010b; Chang *et al.*, 2016; Bannister, Kucharczyk and Dickenson, 2017; Bannwarth and Kostine, 2017; Lane and Corr, 2017). Importantly, adulthood skeleton is mainly innervated by nociceptive Aδ and C peptidergic nerve fibres mostly positive for TrkA and therefore, sensitive to NGF (G Castañeda-Corral *et al.*, 2011;

Patrick W. Mantyh, 2014). Studies have also suggested a direct role of NGF/TrkA in bone metabolism (Asaumi *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 2006; Tomlinson *et al.*, 2016). Taken together, these data suggest that NGF could be directly involved in joint bone metabolism in addition to pain, but the precise downstream effectors of NGF through TrkA, involved in pain and joint damage are far to be fully understood in a RA context.

Since mice lacking TrkA or NGF die shortly after birth, we took the advantage of our generated knock-in TrkA/C mice, a viable mouse model with perturbed NGF/TrkA signalling (Gorokhova *et al.*, 2014). These mice express a chimeric receptor formed by the native extracellular part of TrkA able to bind NGF normally and by the functional transmembrane and intracellular parts of the tyrosine kinase type C (TrkC) receptor: the specific neurotrophin 3 (NT3) receptor. Hence, TrkA expressing cells are able to respond to NGF but activate TrkC intracellular pathways instead of TrkA signalling. NT3 binds TrkC receptor and is especially involved in proprioception with a poor impact on inflammatory pain (Klein *et al.*, 1994). Thus, the aim of our present study is to better understand the involvement of the specific intracellular signalling pathways activated by NGF through TrkA, in the pathophysiology of inflammatory arthritis especially those involved in cartilage and joint bone remodelling and associated chronic pain.

Methods

Animals

Experiments were performed in TrkA/C mice expressing a chimeric TrkA/TrkC receptor from TrkA locus as previously described (Gorokhova *et al.*, 2014) and WT-littermates, from C57Bl/6J background. TrkA/C mice and WT-littermates were bred in our animal facility under the same standard housing conditions (22°C ± 2°C, 40% humidity, 12h light/dark cycles and free access to food and water). Adult mice (males or females) initially 11-12 weeks old and weighing 20-22 g, were used. Experimental protocols were performed in accordance with the 2010/63/UE European Directive and were approved by local ethical committee ((Comité Régional d'éthique en matière d'expérimentation animale Auvergne (CEMEA-Auvergne)). Experiments followed guidelines of the International Association for the Study of Pain (IASP) and ARRIVE. Three different genotypes were used: wildtype TrkA/C mice (WT), heterozygous TrkA/C mice (TrkA/C-Hetero) and knock-in TrkA/C mice (TrkA/C-KI).

CFA-induced monoarthritis (MoAr)

Monoarthritis was induced as previously described by Khairnar et al., 2015. Briefly, a single injection of 12 μ l of Complete Freund Adjuvant (CFA) containing heat-inactivated *Mycobacterium butyricum* (5 mg/ml, DIFCO) in Tween 80, paraffin oil and NaCl 0.9% was intra-articularly administered into the tibio-tarsal joint of the right hind paw of mice on day 0 (D₀) under Isoflurane (1%) anaesthesia. The contralateral hind paw was used as control. Vehicle (Veh) animals received only Tween 80, paraffin oil and NaCl 0.9%.

Paw circumference

Paw circumference of the tibio-tarsal joint was measured at D_0 and at different time points following monoarthritis induction (D_3 , D_6 , D_{14} , D_{24} and D_{30}). Results were presented as the ratio between the ipsilateral pathological paw circumference and the contralateral paw circumference for each animal.

Behavioural assessment

Pain behaviour

Mechanical allodynia

Mechanical allodynia was assessed with von Frey hair using the up-down method of Dixon (Dixon, 1980) modified by Chaplan (S.R. Chaplan *et al.*, 1994). Briefly, animals were placed in individual clear acrylic cubicle place on the top of an elevated wire mesh. Following an habituation period, a set of calibrated nylon von Frey filaments ranging from 0.02 to 1.4g was applied to the plantar surface of the hind paw to calculate the 50% withdrawal threshold for each mice before monoarthritis induction (Baseline) and at different time points of the disease (D₇, D₁₄ and D₂₁).

Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed by the joint/ paw immersion assay using a thermostated water bath set at 46 ± 0.2 °C. Mice were maintained under a soft cloth except for their hind paws, which were alternatively immersed in water until withdrawal (a cut-off of 30s was used to avoid any potential tissue damage). Paw withdrawal latency was assessed for each mouse in duplicate with at least 5 min interval, before monoarthritis induction (Baseline) and at D₇, D₁₅ and D₂₀.

Static weight bearing

Static weight bearing (SWB) apparatus (Bioseb, France) was used to evaluate spontaneous weight distribution between hind paws, which could be a measure of ongoing pain associated with hypersensitivity. Two training sessions were performed to habituate animals to the apparatus and testing room. On the day of testing, mice were placed in a Perspex enclosure so that each hind paw is rested on separate transducer pads. Once the mice were settled and in correct position, the force exerted by each hind limb was measured over a period of 5 seconds. Weight-bearing differences were recorded as an average of four/five trials and expressed as contralateral-ipsilateral readings. The weight distribution was assessed before monoarthritis induction (Baseline) and at D₆ and D₁₃.

Home cage behaviour assessment

PhenoTyper[®]

Home cage behaviour was automatically recorded with the help of a video-tracking system in specially designed cages (45x45x55cm) (PhenoTyper® 4500, Noldus Information technology). Each animal was singly housed in these individual home cages and six animals, at the same time, were recorded (infrared video) with MediaRecorder software during 23h. This method allowed continuous behavioural recordings in both dark and light periods. Video acquisition and analysis were processed with EthoVision XT 13 running the time spent in different zone: "hidden", "wall", "feeder", "drinking" and the automated behaviour recognition system that recognises: "eat", "groom", "jump", "rear unsupported and supported", "rest" and "walk" (van Dam *et al.*, 2013).

In vivo imaging

⁹⁹*mTc*-*NTP* 15-5 and ⁹⁹*mTc*-*HMDP* scintigraphic imaging

In order to evaluate cartilage integrity and bone remodelling, *in vivo* scintigraphic imaging was performed using specific radiotracers. The N-[triethylammonium]-3-propyl-[15]ane-N5 radiolabelled with ^{99m}Technetium (^{99m}Tc-NTP 15-5) which binds specifically to proteoglycans of the cartilage (Miot-Noirault *et al.*, 2007b; A. Khairnar *et al.*, 2015) was used to evaluate cartilage remodelling and a common clinical osteoarticular radiotracer in humans: the hydroxymethylene diphosphonate radiolabelled with ^{99m}Technetium (^{99m}Technetium (^{99m}Tc-HMDP) was employed to appraise bone remodelling.

For ^{99m}Tc-NTP 15-5 imaging, 10 MBq of the radiotracer was injected by intravenous administration in the tail of each animal. 30 minutes later, planar acquisition was performed during 10 minutes (15% window at 140 keV), with the animal placed in ventral decubitus on a parallel collimator (20mm/1.8/0.2) of a gamma camera for small animal (γ Imager®, Biospace) under isoflurane anaesthesia (1%).

Concerning bone remodelling, the bone imaging phase was acquired 2 hours and a half after intra-peritoneal injection of 10 MBq per mouse of the ^{99m}Tc-HMDP (Osteocys®, IBA). Planar

acquisition was performed during 5 minutes (15% window at 140 keV) of the animal placed in ventral decubitus on a parallel collimator (20mm/1.8/0.2) of a gamma camera for small animal (γ Imager®, Biospace) under isoflurane anaesthesia (1%).

Quantitative analysis of scintigrams was performed with Gammavision+ software (Biospace) using fixed-sized rectangular regions of interest (ROIs) on hind paws. For each time and each animal, scintigraphic ratio of cartilage (SR_c) and scintigraphic ratio of bone (SR_b) were both calculated according to the same formula: SR = pathological paw average activity (cpm) / contralateral paw average activity (cpm)

Fluorescent cathepsin K imaging

Bone resorption was assessed *in vivo* using a small animal IVIS Spectrum imaging system (Perkin Elmer). Each mice received 2 nmol/100µl of Cat K 680 FASTTM (Perkin Elmer) by intravenous administration. Six hours later, acquisition was performed under isoflurane anaesthesia (Isoflurane, 1%). Imaging was performed using the ex/em = 675/720 nm bandpass filters. Quantification analysis was performed with Living Image Software using ROIs focused on tibio-tarsal joint and results are presented as the ratio of the total counts of radiant efficiency (radiance (photons per second per square centimetre per steradian) per incident excitation power (microwatt per square cm)) of the pathological paw on the total counts of radiant efficiency of the contralateral paw.

Immunohistochemistry and HES staining

Tibio-tarsal joints

Following a terminal administration of pentobarbital and an intracardiac perfusion of 30 ml of saline NaCl 0.9%, ipsilateral and contralateral tibio-tarsal joints were harvested at D_{14} and D_{30} (n=3-7 animals per group), post fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) for at least 48h at 4°C and decalcified in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 7.6, Sigma) during two weeks at 4°C as previously described (G Castañeda-Corral *et al.*, 2011; Velot, 2011). End point decalcification was conducted by mechanical method. After cryoprotection (PB-Sucrose 30%) for at least 48h, samples were included in tissue freezing medium (O.C.T.). 20 µm cryostat thick frozen

sections of joints were processed, mounted on superfrost slide, blocked with PBS, BSA 1% and, incubated with primary antibodies in PBS + Triton 0.3% overnight at room temperature after three washes in PBS. Peptide-rich sensory nerve fibres were labelled with rabbit anti-CGRP (1:2000, Calbiochem, #PC205L) and monocytes, macrophages and osteoclasts lineage with a rat antibody against a myeloid protein CD68 (1:1000, AbD Serotec, #MCA1957). After three washes with PBS, sections were incubated with the corresponding secondary antibody (1/1000, AlexaFluor® 488) and then counterstain with nuclear DAPI (diamidino-2-phenyl-indole, dihydrochloride, 1:4000) for 5 minutes and washed three times with PBS. Sections were then cover-slipped with fluorescent mounting medium (Dako) and finally observed with Nikon Eclipse Ni-E microscope. Quantitative analysis were performed with NIS-Elements software and at least 5-6 sections per paw per animal (n=5/group) were quantified using ROIs on tibio-tarsal joint.

Additional joint slides were stained with haematoxylin, eosin and saffron (HES) to visualise joint structure as previously described (Schmitz *et al.*, 2010)

RNA Sequencing

To investigate global mRNA changes, we used RNA sequencing analysis on L4-L5-L6 DRGs at the inflammatory peak of the monoarthritis (D₁₄). WT and TrkA/C-KI mice injected with CFA or vehicle (4 mice per group) were terminally anesthetised and L4-L5-L6 DRGs were quickly harvested, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Total RNA of L4-L5-L6 DRGs was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined using Take3 nucleic acid quantification plate (Epoch, BioTek, USA). RNA integrity was analysed by a parallel capillary electrophoresis instrument (Fragment Analyser, Agilent®) and sent to Montpellier GenomiX platform (MGX, http://www.mgx.cnrs.fr) for RNA sequencing. Libraries were prepared using Universal Plus mRNA-seq kit (NuGEN) and a SBS based sequencing was achieved using a HiSeq 2500 platform (Illumina). Analysis was performed in different steps: splice junction mapping (TopHat2), counting (HTSeq-count), filtering, normalization (edgeR, DESeq and DESeq2) and differential analysis (edgeR, DESeq and DESeq2) performed by MGX platform.

Quantitative PCR on tibio-tarsal joint RNA

To investigate changes in bone metabolism/remodelling, we also used quantitative PCR (q-PCR) to evaluate the expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the tibio-tarsal joint at D_{14} . TRAP is a lysosomal enzyme released by osteoclast during bone resorption and is considered as a valuable tool to assess mature and activated osteoclast. WT and TrkA/C-KI mice injected with CFA or vehicle (n=5 mice/group) were terminally anesthetised and ipsilateral pathological ankle joint were harvested, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Frozen joints were pulverized with a biopulveriser followed by RNA extraction with TRIzol using tissue lyser (30 Hz frequency for 2min with 2 cycles, Qiagen). RNA concentration was quantified using Take3 nucleic acid quantification plate (Epoch, BioTek, USA). Equal amounts of RNA from each sample were reverse transcribed in 20 μ l to produce cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's recommendation.

SYBR Green-based detection was carried out on a real-time PCR instrument (RealPlex, Eppendorf, GmBH) with thermal cycler conditions established preliminary for forward and reverse primers (*TRAP primers:* F: CACATAGCCCACACCGTTCTC, R: TGCCTACCTGTG TGGACATGA). In each experiment, samples were assayed in triplicate. Data were analysed using the threshold cycle (Ct) relative quantification method. Relative quantities (RQ) were determined using the equation: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. HPRT was used as housekeeping gene.

Joint IL-6 content

At D₁₄ following CFA or Veh administration, 4-7 animals in each group were terminally anaesthetised using pentobarbitone. The ipsilateral tibio-tarsal joint was excised and snap frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were then crush in liquid nitrogen with a pilar and mortar and subsequently homogenized in lysis buffer (137mM NaCl, 20mM TrisHCl, 1% NP40, 10% glycerol, 1mM PMSF, 10µg/mL aprotinin, 1µg/mL leupeptin, 0.5mM sodium vanadate) using a glass homogenizer. Homogenates were then centrifuged at 14,000 x g for 10min at 4°C and supernatants were collected. Whole cell lysates were next titrated to determine their protein concentrations using a BCA Protein Assay kit (Pierce, UK). Mouse II-6 joint content, a pro-iflammatory cytokine, was measured using a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique according to the manufacturer's guidelines (DuoSet Elisa #DY406, R&D system, Minneapolis, USA). Samples were processed in triplicate and values were calculated from the standard curve.

Statistics

All data are reported as mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Data were analysed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism version 6.00 and 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA) using analysis of variance (one or two way ANOVA) followed by Tukey or Bonferroni post-hoc tests for multiple comparisons as indicated in the figure legends. In all cases, the significance level was set at p \leq 0.05.



Figure 1: (**A**) Experimental design and timeline of the behavioural tests (*i.e.* von Frey, paw immersion test, static weight bearing), fluorescent and scintigraphic imaging assessment and sampling performed in wild-type (WT MoAr), heterozygous (TrkA/C-Hetero MoAr) and knock-in (TrkA/C-KI MoAr) monoarthritic mice and control wild-type mice (WT Veh) and control knock-in TrkA/C mice (TrkA/C-KI Veh) before and after CFA-induced monoarthritis. (**B**)(**C**)(**D**)(**E**) Effect of CFA induced-arthritis on mechanical allodynia (**B**)(**C**) and thermal hyperalgesia (**D**)(**E**) of the ipsilateral paw in WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr, TrkA/C-KI MoAr and TrkA/C-KI MoAr compared to WT and TrkA/C-KI vehicle in males (**B**)(**D**) and in females (**C**)(**E**). (**F**) Static weight bearing analysis in WT MoAr and TrkA/C-KI MoAr or vehicle male mice. Results are presented as mean ± SEM, n=8-16 animals per group. One-way or Two-way ANOVA followed by a Tuckey *post hoc* test, * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001 compared to WT And TrkA/C-Hetero MoAr mice; ° p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; °** p ≤ 0.001 compared to TrkA/C-Hetero MoAr mice.

Results

We performed a multimodal study in wild-type littermates (WT MoAr), heterozygous TrkA/C (TrkA/C-Hetero MoAr) and knock-in TrkA/C (TrkA/C-KI MoAr) monoarthritic mice compared to wild-type (WT Veh) and knock-in TrkA/C (TrkA/C-KI Veh) vehicle mice (see **Fig. 1A** for details).

Assessment of pain behaviours following CFA in TrkA/C and WT mice

Mechanical allodynia was assessed before MoAr induction (Baseline) and at different time points following CFA administration (*i.e.* D₇, D₁₄ and D₂₁) in both males (**Fig. 1B**) and females (**Fig. 1C**). No difference in baseline mechanical paw threshold was observed between the different genotypes and sexes (**Fig. 1B&C**). As expected, CFA induced-arthritis is associated with a significant decrease of the 50% mechanical threshold of the pathological paw in WT MoAr compared to WT Veh or baseline. Mechanical allodynia started at D₇ with an average decrease of 74.9% \pm 3.7% in males WT MoAr compared to males WT Veh (**Fig. 1B**) and of 96% \pm 0.7% in females WT MoAr compared to baseline (**Fig. 1C**). Mechanical allodynia development was similar in males and females TrkA/C-Hetero MoAr compared to WT Veh and baseline, respectively. However, this was significantly reduced in TrkA/C-KI MoAr mice with only an average decrease of 29.3% \pm 14.5% in males compared to males TrkA/C-KI Veh (**Fig. 1B**) and of 55% \pm 6.5% in females compared to baseline (**Fig. 1C**). This difference persists during the all study.

Thermal hyperalgesia at 46°C was assessed before MoAr induction (Baseline) and at D₇, D₁₅ and D₂₀ following CFA in both males (**Fig. 1D**) and females (**Fig. 1E**). Similar results were obtained in the different genotypes (*i.e.* WT, TrkA/C-Hetero and TrkA/C-KI) and gender with a significant decrease of thermal paw withdrawal threshold of the pathological paw, suggesting that thermal hyperalgesia development was not affected in TrkA/C-Hetero and TrkA/C-KI mice following CFA (**Fig. 1D&E**).



Figure 2 : (A) Left panel: Picture illustrating the tibio-tarsal joint circumference (represented by a red double arrow) changes observed in ipsilateral joint compared to contralateral joint from CFA induced-arthritis mice. **Right panel**: Time course of oedema development of the pathological joint following CFA represented by the difference in tibiotarsal joint circumference between ipsilateral and contralateral joint in WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice compared to WT Veh mice. (B) Interleukine-6 joint content on total protein joint extraction assessed by Elisa immuno-labelling using an anti CD68 antibody. (C) Quantification of CD68 positive cells immunofluorescence in ROI (2500 x 2500 µm) focused on the contralateral or the ipsilateral tibio-tarsal joint in WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr at D₁₄ and D₃₀. Data are expressed as arbitrary unit (A.U) (D) Left panel: Picture showing the whole tibio-tarsal joint stained with HES. **Right panel**: Representative micrographs of CD68⁺ cells on the contralateral or the ipsilateral tibio-tarsal joint stained with HES. **Right panel**: Representative micrographs of CD68⁺ cells on the contralateral or the ipsilateral tibio-tarsal joint at D₁₄ and D₃₀. scale bar = 100 µm. Results are presented as mean ± SEM, n=8-12 animals per group. *** p ≤ 0.001 compared to WT Veh mice; ° p ≤ 0.05; $^{\circ}$ p ≤ 0.01 compared to WT MoAr mice; $^{\$}$ p ≤ 0.05; $^{\$}$ p ≤ 0.001 compared to contralateral joint.

We also evaluated ongoing pain behaviour using a static weight bearing test in males mice. Weight bearing between contralateral and ipsilateral paws showed an early postural disequilibrium only in males WT and TrkA/C-Hetero MoAr mice at D₆ which is almost restored at D₁₃, except in WT MoAr mice (**Fig. 1F**). TrkA/C-KI MoAr mice presented no deficit in weight bearing at any time points (**Fig. 1F**).

Finally, twenty three hours automated measurement of spontaneous behaviour in males' mice was performed with a video tracking system between D₁₅ and D₁₉ following CFA. No difference was observed on different types of behaviour such as rearing, eating, drinking, digging, grooming between MoAr and vehicle mice regardless of the genotype (data not show). However, TrkA/C-KI MoAr or Veh mice seem more active than WT mice as illustrated by an increase of the distance moved during the night or the day periods (**Supplementary Fig. 1A**) or per hour (**Supplementary Fig. 1B**), as well as the cumulative time spent in hidden zone during the night (**Supplementary Fig. 1C**) or per hour (**Supplementary Fig. 1D**). There was no significant difference between WT MoAr and WT Veh.

Assessment of different inflammatory parameters following CFA in TrkA/C and WT mice

A significant increase of the circumference of the tibio-tarsal joint following CFA (left picture, **Fig. 2A**) was observed with a similar difference in paw circumference between ipsilateral and contralateral paw of WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice compared to WT Veh mice (right panel, **Fig. 2A**). The average increase was $64.1\% \pm 9.5\%$ in MoAr mice compared to WT Veh mice, starting at D₃ post-injection and lasting up to D₃₀ regardless of the genotypes (right panel, **Fig. 2A**). No difference was also observed in haematoxylin, eosin and saffron staining of tibio-tarsal joint with similar damage of the cartilage and bone as well as immune cells infiltration in the different MoAr mice (**Supplementary Fig. 2**). CFA injection induces a local and systemic release of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) (Tekieh *et al.*, 2011).



Figure 3 : (A) Cartilage remodelling assessed by scintigraphic imaging. Effect of CFA-induced monoarthritis on 99mTc-NTP-15-5 accumulation in the pathological and contralateral joint in WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice and control (WT Veh) mice at D₃, D₁₄ and D₂₄. Time course illustration (left panel) and cartilage scintigraphic ratio (SRc) quantification (right panel) are showed. (B) Bone remodelling assessed by scintigraphic imaging. Effect of CFA-induced monoarthritis on 99mTc-HMDP accumulation in pathological and contralateral joint of WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice and control (WT Veh) mice at D₅, D₁₈ and D₂₈. Time course illustration (left panel) and bone scintigraphic ratio (SR_b) quantification (right panel) are showed. Results are presented as mean \pm SEM, n=3-12 animals per group. Two-way ANOVA followed by a Tuckey *post hoc* test, * p \leq 0.05; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$ compared to WT Veh. (C) Fluorescent Imaging - Bone resorption. Effect of CFA-induced monoarthritis on cathepsin K fluorescent imaging in WT MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice at D₂₀. Illustration (left panel) and bone resorption ratio quantification (right panel) are showed. Results are presented ± SEM, n=5 animals per group. Non parametric Mann-Whitney test, $\circ p \le 0.05$ compared to WT MoAr mice. (D) Expression of mature and activated osteoclast marker Trap in ipsilateral tibiotarsal joint RNA extract from WT MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice and control (WT Veh and TrkA/C-KI Veh) mice at D_{14} . Results are presented as mean ± SEM, n=5 animals per group. One-way ANOVA followed by a Holm-Sidak *post hoc* test, $\circ \circ p \le 0.01$; $\circ \circ \circ p \le 0.001$ compared to wild-type monoarthritic mice.

We therefore assessed IL-6 content in the tibio-tarsal joint using an ELISA assay (**Fig. 2B**). IL-6 joint content was similarly increased in the ipsilateral joint compared to the contralateral joint in both WT MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice, despite a slight increased for the latest group. Furthermore, monocytes, macrophages and osteoclasts lineage was immunostained with an anti-CD68 antibody. First, no difference was observed between contralateral paw CD68 staining at D₁₄ and D₃₀ between the different genotypes (**Fig. 2C&D**). However, CFA induced a significant increase of CD68 positive cells in the ipsilateral pathological paw of WT MoAr mice compared to the contralateral paw at D₁₄ and D₃₀ (**Fig. 2C&D**). By contrast, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr mice exhibited a significant decrease of CD68⁺ staining in the pathological paw at D₃₀ compared to WT MoAr mice (**Fig. 2C&D**).

Assessment of cartilage and bone remodelling/erosion following CFA in TrkA/C and WT mice

Cartilage and bone remodelling occurred during the course of RA (Pap and Korb-Pap, 2015; Smolen *et al.*, 2018) where NGF could play an important role. We therefore used scintigraphic imaging to assess cartilage and bone remodelling *in vivo*.

Khairnar *et al.* (2015) have recently demonstrated that ^{99m}Tc-NTP 15-5 could be a useful tool to follow cartilage integrity *in vivo*. In agreement with this study, ^{99m}Tc-NTP 15-5 accumulation was significantly increased in the pathological paw of all MoAr mice regardless of the genotype (left scintigrams, **Fig. 3A**). The scintigraphic ratio of cartilage (SR_c), which is equal to 1.03 ± 0.04 in WT Veh mice, was significantly increased in MoAr mice from D₃ up to D₂₄ regardless of the genotype (right histograms, **Fig. 3A**).

^{99m}Tc-HMDP which bind to hydroxyapatite crystals of the mineral fraction of bone was used to investigate bone remodelling at D₅, D₁₈ and D₂₈ (**Fig. 3B**). As expected in WT mice, CFA inducedarthritis is associated with a hyper fixation of the radiotracer in the pathological paw compared to the contralateral paw (left scintigrams, **Fig. 3B**). Scintigraphic ratio of the bone (SR_b), which is equal to 1.03 ± 0.05 in WT Veh mice, was significantly increased only in WT MoAr mice from D₅ to D₂₈ with a



Figure 4 : (**A**) Representative photomicrographs of CGRP positive peptidergic fibres on ipsilateral tibiotarsal joint in (**a**) wild-type control (WT Veh), (**b**) wild-type (WT MoAr), (**c**) heterozygous (TrkA/C-Hetero MoAr) and (**d**) knock-in (TrkA/C-KI MoAr) monoarthritic mice at D₁₄. Scale bar = 250 μ m. (**B**) Histogram of CGRP+ positive fibres quantification in ROI (800 x 800 μ m) focused on the contralateral or the ipsilateral tibiotarsal joint in WT Veh, WT MoAr, TrkA/C-Hetero MoAr and TrkA/C-KI MoAr. Results are presented as mean ± SEM, $p \le 0.05$, $p \le 0.01$ compared to contralateral paw; $\infty p \le 0.001$ compared to wild-type monoarthritic mice.

maximum at D₁₈ compared to WT Veh, indicating bone remodelling (right histograms, **Fig. 3B**). However, TrkA/C-Hetero and TrkA/C-KI MoAr mice did not exhibit such a significant radiotracer hyper fixation, suggesting reduced bone remodelling (**Fig. 3B**). In order to confirm change in osteoclast activity in TrkA/C mice following CFA, we assessed bone resorption using *in vivo* fluorescent cathepsin K imaging. While CFA induced a significant increase of Cath K activity in the ipsilateral joint of WT mice at D₁₄, TrkA/C-KI MoAr mice did not compared to WT MoAr mice (illustration and histograms, **Fig. 3C**). Finally, we investigated tartrate-resistant acid phosphatase (*Trap*) expression within the tibio-tarsal joint using q-PCR. We did not observe any difference in TRAP expression in the contralateral joint between WT and TrkA/C-KI Veh mice. However, WT MoAr mice displayed an increase of *Trap* mRNA ipsilateral joint expression compared to WT Weh while TrkA/C-KI MoAr mice exhibited a significant decrease of TRAP expression compared to WT MoAr (**Fig. 3D**).

Taken together, these results clearly demonstrated a reduction of bone remodelling and osteoclast activity in TrkA/C-KI mice compared to WT following CFA.

Assessment of joint peptidergic innervation following CFA in TrkA/C and WT mice

Arthritis is characterised by NGF-dependent sprouting of peptidergic nerve fibres which seems to be involved in chronic pain process (Ghilardi *et al.*, 2012; Patrick W. Mantyh, 2014). We therefore performed an immunohistochemical analysis of CGRP sprouting in the tibio-tarsal joint at D₁₄ following CFA or vehicle. First, we observed a deficit of peptidergic innervation in the contralateral tibio-tarsal joint of TrkA/C-KI MoAr mice compared to WT Veh, WT MoAr and also TrkA/C-Hetero MoAr mice, indicated by a significant decreased of CGRP staining (**Fig. 4B**). This result in agreement to our previous report showing reduce peripheral innervation in the skin in TrkA/C-KI mice (Gorokhova *et al.*, 2014). As expected, the ipsilateral joint of WT MoAr mice exhibited a significant sprouting of peptidergic nerve fibres, marked by an increase of CGRP staining, compared to the contralateral joint and WT Veh (**Fig. 4A&B**). Interestingly, we also found a similar increase of CGRP sprouting in the ipsilateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice as increase of CGRP sprouting in the ipsilateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint and WT Veh (**Fig. 4A&B**). Interestingly, we also found a similar increase of CGRP sprouting in the ipsilateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-Hetero MoAr mice compared to the contralateral joint of TrkA/C-



Figure 5: (**A**) Venn diagram illustrating the number of differentially expressed genes (DEGs) (DESeq2, p-value < 0.05) between TrkA/C MoAr, TrkA/C Saline, WT MoAr and WT Saline. (**B**) Number of down-regulated and up-regulated DEGs for each comparison (*i.e.* TrkA/C MoAr *vs* WT MoAr, TrkA/C MoAr *vs* WT Veh and TrkA/C Veh *vs* WT Veh). (**C**)(**D**) Heat maps of Gene Ontology (GO) analysis in term of Biological Process of sensory perception of pain (**C**) and response to mechanical stimulus (**D**).

joint and WT Veh. However, TrkA/C-KI MoAr mice did not display any increase of CGRP⁺ nerve fibres sprouting (**Fig. 4A&B**).

Assessment of transcriptomic gene expression in DRGs innervating the joint in TrkA/C and WT mice

We compared the transcriptomes of L4-L5-L6 DRGs of WT Vehicle, WT MoAr, TrkA/C-KI Vehicle (TrkA/C Veh) and TrkA/C-KI MoAr (TrkA/C MoAr) at D₁₄ by RNA sequencing analysis. A total of 353 differentially expressed genes (DEGs) between TrkA/C Veh and WT Veh, 396 DEGs between TrkA/C MoAr and WT Veh and 452 DEGs between TrkA/C MoAr and WT MoAr were significantly dysregulated (**Fig. 5A**). The figure 5B presents the number of down-regulated and up-regulated DEGs for each condition. Around 50% of DEGs were up or down regulated regardless of the comparison except for the TrkA/C MoAr vs WT MoAr were most of the DEGs are down-regulated.

Gene ontology analysis for each comparison was also generated. Here, we only focused on GO of sensory perception of pain (**Fig. 5C**) and response to mechanical stimulation (**Fig. 5D**) between TrkA/C MoAr *vs* WT MoAr, TrkA/C MoAr *vs* WT Veh and TrkA/C Veh *vs* WT Veh. DEGs fold change values for these two sensory modalities and each comparisons were converted into heat maps (**Fig. 5C&D**). In addition, fold change values are presented in figure 6. We found a down-regulation of ionic channels potentially involved in mechanical hypersensitivity such as *Asic3* or *Traak* (*kcnk4*) in TrkA/C-KI mice compared to WT Veh mice (**Fig. 5 & Fig. 6**). We also observed a down-regulation of ionic channels involved in thermal hypersensitivity such as *Trpv1* but this decrease could be compensate by an up-regulation of *Ano1* and *Nav1.9*. TrkA/C-KI Veh or MoAr mice displayed a decrease of mRNA expression of some neurotransmitters such as Substance P (*Tac1*) and CGRP (*Calca*) (**Fig. 5C & Fig. 6A**) while TrkA/C MoAr mice showed a specific down-regulation of glutamate metabotropic receptor 1 (*Grm1*) compared to WT MoAr mice (**Fig. 5C & Fig. 6A**). Very interestingly, a specific decrease of *c-Jun* signalling in TrkA/C KI MoAr mice compared to WT MoAr mice was observed (**Fig. 5D & Fig. 6B**).

Α

G) : 0019233 - Sensory perception of pain	TrkAC MoAr vs WT Moar	TrkAC MoAr vs WT Veh	TrkAC Veh vs WT Veh
Anol	Anoctamin-1	0.736088734241178	0.930533386383624	0.866889553652796
Асрр	Prostatic acid phosphatase	0.163167051700919	0.272043396447315	0.281800568934754
Adcyap I	Adenylate cyclase activating polypeptide I	-0.622962014467116	-0.471998292915761	-0.463367801626165
Adora I	Adenosine A1 Receptor	-0.186971930022444	-0.114426611215992	-0.0767301940246854
Asic3	ASIC3	-0.409286611510678	-0.303302153985491	-0.387960903887282
Cacna l e	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha I E	-0.786605093972909	-0.804408841849319	-0.269667467567801
Calca	Calcitonin-related polypeptide alpha	-0.705512445400163	-0.800309436221493	-0.905758859398138
Cnr I	Cannabinoid Receptor I	-0.291552119007562	-0.283744339512597	-0.153315252643658
Crhr2	Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2	-0.530509616760065	-0.671902396010318	-0.421585119472515
Ednra	Endothelin-I receptor	0.415609377395715	0.279524035396079	0.382602772427961
F2r	Coagulation factor II thrombin receptor	-0.801980216920693	-0.7624676045301	-0.795241559958996
Fgfr I	Fibroblast Growth Factor Receptor I	-0.198141890346838	-0.195849518489881	-0.151327747731264
Grik l	Glutamate receptor, ionotropic, kainate I	0.29205156747072	0.381575635700903	0.278847593531682
Grm I	Glutamate Metabotropic Receptor I	-2.3514455180729	-0.531789842956417	0.360355170491346
Hoxd I	Homeobox D1	-0.359081314403625	-0.415613633865183	-0.453084854033275
Kcna2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 2	0.0783167318812523	0.20417069619752	0.270286461045602
Kcnd2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 2	0.373446643438893	0.53190931758708	0.778035403625175
Kcnip3	Calsenilin	-0.322702034650203	-0.243403338927222	-0.306904088959877
Kcnk4	TRAAK	-0.485619730691012	-0.637857861010274	-0.546175941126486
Mgll	Monoglyceride lipase	-0.323499144864472	-0.288483020722999	-0.231719212517912
Mme	Membrane Metalloendopeptidase	0.255369480460985	0.10442529668017	0.352327565031396
Ndn	Necdin	-0.626722074652519	-0.838485261499553	-0.885905394870402
Ngfr	p75 ^{NTR}	-0.748767526384297	-0.66144114840504	-0.588835535696564
Nos I	Nitric oxide synthase I	-0.458720140606491	-0.357317038592822	-0.170747206771029
Npy I r	Neuropeptide Y Receptor YI	-0.219331909845718	-0.321418247501396	-0.182826480634533
Nþy2r	Neuropeptide Y Receptor Y2	-0.0779579339035433	0.227730769756577	0.342324781684006
Ntrk I	TrkA	-2.52896869378947	-2.59712829656041	-2.52057530477595
Oprk I	Opioid Receptor Kappa I	-1.02394904437683	-0.900337922110506	-0.387910431414528
Oprm I	Opioid Receptor Mu I	-0.569344128672752	-0.393994950492809	0.036735764506908
P2ry2	Purinergic Receptor P2Y2	-0.308388574503878	-0.223632032973649	-0.228745368676243
Phf24	PHD Finger protein 24	0.18103259881542	0.350678921442951	0.353853384457157
Reln	Reelin	0.0574588838410265	0.119644553439288	0.374129701059257
Scn11a	Nav1.9	0.168102737196689	0.390656785887285	0.337188972518524
Tacl	Substance P	-0.490669540180932	-0.518205059880117	-0.569911292446669
Tmem I 00	Transmembrane Protein 100	-0.699277868140383	-0.606455518354998	-0.625213232398983
TrpvI	TRPVI	-0.582898392179992	-0.612807385103689	-0.44962430563395

В

GQ : 0009612 - Response to mechanical stimulus		TrkAC MoAr vs WT Moar	TrkAC MoAr vs WT Veh	TrkAC Veh vs WT Veh
Asic2	ASIC2	0.0967167920956748	0 231117025701157	0 121563917464986
Asic3	ASIC3	-0.409286611510678	-0 303302153985491	-0 387960903887282
Atp I a I	ATPase Na+/K+ Transporting Subunit Alpha 1	-0.223153966225033	-0.113771852299581	-0.155421687294707
Cavl	Caveolin-I	0.301407900574482	0.0250716759298131	0.0798623690068521
Drd2	Dopamine receptor D2	-0.99674678364806	-1.03543275621739	-0.582087568600915
Etv l	ETS Variant I	0.542592363989456	0.580802765587073	0.583320548219857
Inhbb	Inhibin Subunit Beta B	0.88890559020578	1.12095045143734	0.8005254436461
Jun	Jun	-0.365267566120323	0.00777816903787458	0.0815079969996964
Jup	Junction Plakoglobin	-0.37842722969134	-0.204881199073554	-0.1989130597977
Kcnk4	TRAAK	-0.485619730691012	-0.637857861010274	-0.546175941126486
Lrp I I	LDL Receptor Related Protein 11	0.157544583031127	0.0227629805192235	0.106426172954078
Nos I	Nitric oxide synthase I	-0.458720140606491	-0.357317038592822	-0.170747206771029
Nos I ap	Nitric Oxide Synthase I Adaptor Protein	0.608790862046828	0.623470723306221	0.563379280111074
Ntrk l	TrkA	-2.52896869378947	-2.59712829656041	-2.52057530477595
Pde2a	Phosphodiesterase 2A	-0.247546433680704	-0.204294517719561	-0.152116186297445
Phf24	PHD Finger protein 24	0.18103259881542	0.350678921442951	0.353853384457157
Ptprq	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type Q	-0.98027610496001	0.133681371221397	-0.345135183602514
Stra6	Stimulated By Retinoic Acid 6	1.3723127404097	0.439566771233581	0.413565835774282
Ttn	Titin	3.09401659917132	0.916631816774744	4.43055386071166

Figure 6 : (**A**)(**B**) Fold change values of each (DEGs) between TrkA/C MoAr *vs* WT MoAr, TrkA/C MoAr *vs* WT Veh and TrkA/C Veh *vs* WT Veh for sensory perception of pain (**A**) and response to mechanical stimulus (**B**). Grey values are not differentially expressed significantly (DESeq2, p-value ≤ 0.05).



Supplementary Figure 1 : (**A**) Distance moved during night (left) and day (right) or (**B**) per hour during 23 hours. (**C**) Time spent in hidden zone during night (left) and day (right) or (**D**) per hour during 23 hours in WT Veh, WT MoAr, TrkA/C-KI Veh and TrkA/C-KI MoAr. Behaviours were assessed using home cage video tracking system (Phenotyper, Noldus). Results are presented as mean \pm SEM, n=8-13 animals per group. One-way or Two-way ANOVA followed by a Tuckey *post hoc* test * p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; ***p \leq 0.001 compared to WT Veh mice; ° p \leq 0.05; °° p \leq 0.01; °°° p \leq 0.001 compared to WT MoAr mice.


Supplementary Figure 2: Pictures showing large illustrations of the whole tibiotarsal joint stained with HES of the contralateral and ipsilateral tibio-tarsal of WT MoAr and TrkA/C-KI MoAr at D_{14} . Scale bar = 100 μ m

Discussion

The present study has demonstrated a specific involvement of NGF/TrkA signalling pathways in mechanical hypersensitivity and bone resorption following CFA-induced arthritis. In mice expressing a chimeric TrkA/C receptor, we observed a specific decrease of mechanical hypersensitivity while heat hyperalgesia was unaffected and, a reduction of bone remodelling characterised by a significant decrease of bone resorption and markers of osteoclast activity. These results were not associated with significant changes in different inflammatory parameters. More than a lack of peripheral CGRP nerve sprouting, RNA sequencing analysis on lumbar DRGs suggested a reduction of the expression of some neurotransmitters, putative mechanotransducers and specific TrkA signalling pathways (*i.e.* c-Jun) in TrkA/C mice compared to wild-type.

As expected, CFA induced-arthritis is associated with mechanical allodynia and heat thermal hyperalgesia in wild-type mice (Chillingworth and Donaldson, 2003; Gauldie *et al.*, 2004; A. Khairnar *et al.*, 2015). However, an important decrease of mechanical hypersensitivity but not heat thermal hyperalgesia development was observed in TrkA/C mice compared to wild-type mice, independently of the gender. This specific reduction of mechanical hypersensitivity in TrkA/C mice extends our previous results with others pain models: visceral (cystitis), somatic injury (post-operative pain model and intraplantar CFA) and systemic NGF administration (Gorokhova *et al.*, 2014; Chaumette *et al.*, 2018), which undoubtedly, emphasised the crucial role of NGF/TrkA specific signalling pathways in mechanical hypersensitivity development. Mechanical and thermal hyperalgesia induced by NGF involve different mechanisms but the precise mechanisms remain disputed, especially for mechanical hypersensitivity (Lewin, Ritter and Mendell, 1993; Lewin, Rueff and Mendell, 1994; Nicol and Vasko, 2007).

During inflammation, joint mechanical hypersensitivity is dependent of both the activation of high-threshold mechanonociceptors (A δ and C fibres) and silent mechanonociceptors which are highly expressed in the joint structure (Delmas, Hao and Rodat-Despoix, 2011; Prato, Francisco J Taberner, *et al.*, 2017). One rather unique aspect of the sensory innervation of bone and joint is that the majority (80%) of myelinated A δ (NF200⁺/CGRP⁺) and unmyelinated C (NF200⁻/CGRP⁺) sensory nerve fibres express TrkA and are, therefore, sensitive to NGF (G Castañeda-Corral *et al.*, 2011; Ghilardi *et al.*, 2012; Patrick W Mantyh, 2014; Ashraf *et al.*, 2016). Moreover, silent mechanonociceptors, which account for about 50% of deep tissue nociceptors such as in the joint, are activated and sensitised by NGF *via* TrkA after injury (Hirth *et al.*, 2013; Prato, Francisco J Taberner, *et al.*, 2017). Finally, specific TrkA inhibition reduced mechanical sensitivity in joint/bone pain (Ghilardi *et al.*, 2012; Ashraf *et al.*, 2016; Nencini *et al.*, 2017). These studies suggest a crucial role of TrkA activation by NGF in mechanical hypersensitivity development in joint pain since NGF-induced mechanical allodynia also persists in *p*75^{NTR//} mice (Bergmann *et al.*, 1998). A reduction of synovitis could not be taken into account to explain the lack of mechanical hypersensitivity development in TrkA/C mice as no difference in several inflammatory parameters (*i.e.* joint oedema, joint IL-6 content and joint histological evaluation) was observed between WT and TrkA/C mice following CFA. CFA-induced hind paw edema as well as osteochondral pathology in models of osteoarthritis were also not significantly modified by anti-NGF or anti-TrkA treatments (Shelton *et al.*, 2005b; Nwosu *et al.*, 2016) although AR786, a specific TrkA inhibitor, exhibited some disease-modifying effects in the collageninduced arthritis rat model (Ashraf *et al.*, 2016).

Eighteen (Garip *et al.*, 2015) to 36% (Perrot *et al.*, 2013) of RA patients present a neuropathic pain component, which is partially supported by the presence of sensory nerve sprouting, especially peptidergic fibres, in arthritic joints of animal models, promoting pain symptoms (Ghilardi *et al.*, 2012; Longo, Osikowicz and Ribeiro-da-Silva, 2013). This phenomenon involved the specific activation of TrkA by NGF. Here, we did not see peptidergic fibres sprouting in the joint of monoarthritic TrkA/C mice compared to WT mice. This absence of sensory nerve sprouting could contribute to the specific decrease of pain symptoms observed in TrkA/C mice but could not explain by its own the specific lack of mechanical hypersensitivity. Indeed, heat hyperalgesia, which is mainly mediated by unmyelinated peptidergic fibres (Cavanaugh *et al.*, 2009b), should be also affected. Disrupted TrkA intracellular pathways and subsequent transcriptional changes of, for example, acid-sensing ion channel-3 (ASIC-3), bradykinin receptors, voltage-gated sodium and calcium channels, and putative mechanotransducers expression induced by NGF, is more likely to explain this specific lack of mechanical hypersensitivity development.

Other than pain symptoms, RA is characterised by joint remodelling (Colebatch et al., 2013). Imaging studies show a precocious accumulation of osteoblasts/osteoclasts adjacent to bone erosions and joint sites near inflammatory synovial tissue in RA patients (Buchbender et al., 2012). This bone remodelling reflects an attempt of reactive bone repair and an increase of osteoclast activity (Buchbender et al., 2012). RA is also characterised by a loss of cartilage integrity (Aletaha, Funovits and Smolen, 2011; Smolen et al., 2018). NGF seems to be directly involved in joint metabolism since it can promote cartilage differentiation and fracture healing process (Sang et al., 2017), but the precise mechanisms remain to be clarified. We have demonstrated a specific reduction of bone remodelling in TrkA/C mice compared to WT mice, while cartilage remodelling remained unaffected. This reduced bone remodelling is associated with a significant decrease of cathepsin K activity and tartrateresistant acid phosphatase (TRAP) released. These results strongly suggest that NGF through the activation of specific TrkA signalling pathways promotes osteoclast activity leading to bone remodelling/erosion in arthritis. Interestingly, accelerated arthropathies have been seen in a proportion of anti-NGF treated patients (Chang et al., 2016; Bannister, Kucharczyk and Dickenson, 2017; Bannwarth and Kostine, 2017). However, our results suggest a specific beneficial effect of TrkA inhibition on bone remodelling. Hochberg (2015) suggested that anti-NGF by its own, is not responsible for accelerated arthropathies but could be rather dependant on p75NTR activation by NGF. Further investigations are definitely needed.

To better understand molecular changes in TrkA/C mice, we performed a transcriptomic analysis of lumbar DRGs. Before considering these transcriptomic data, it is important to note that we have previously showed that retrograde transport of NGF/TrkA complex toward the DRG (Chaumette *et al.*, 2018), a functional event essential to maintain NGF/TrkA transcriptional functions to induce sensitisation of DRGs neurons, is unchanged in TrkA/C mice (Patrick W Mantyh, 2014; McWilliams and Walsh, 2017a). While around half of differentially expressed genes (DEGs) were up or down regulated in arthritic or control TrkA/C mice compared to control WT mice, more downregulated DEGs were found in DRGs of arthritic TrkA/C mice compared to arthritic WT mice. Among them, TrkA/C mice exhibit a significant down-regulation of the main ionic channel involved in NGFinduced heat thermal hyperalgesia: the Transient Receptor Potential vanilloïde 1 (TRPV1) (Shu and Mendell, 1999; Huang, Zhang and McNaughton, 2006) which requires, in the first place, TrkA receptor activation as previously demonstrated in *p75NTR-/-* mice and naked-mole rats (Bergmann *et al.*, 1998; Park et al., 2008; Omerbašić et al., 2016). Surprisingly, we did not observed any difference in heat hyperalgesia between WT and TrkA/C monoarthritic mice. In light of RNA sequencing data, we rather conceive a compensatory mechanism involving an increase of other putative thermal sensors such as the calcium-activated chloride channel anoctamin 1 (Ano1) or the voltage-gated $Na_v 1.9$ (Scn11a) channel. These channels act as a heat transductor or in the genesis of thermal hypersensitivity, respectively, in nociceptive neurons in inflammatory conditions (Lolignier et al., 2011; Cho et al., 2012; B. Lee et al., 2014). In another hand, RNA sequencing analysis revealed a down-regulation of neuromodulators involved in central sensitization with both a decrease of CGRP (Calca) and substance P (Tac1) mRNA expression associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1) only in monoarthritic condition, which could partially prevent mechanical hypersensitivity development (Westlund, 2006; Latremoliere and Woolf, 2009; Mantyh et al., 2011). However, brainderived neurotrophic factor (Bdnf) expression, another key contributor of central sensitization, upregulated by NGF in inflammatory conditions, was not affected (Kerr et al., 1999; Pezet and McMahon, 2006; Mantyh et al., 2011). More interestingly, we observed a significant down regulation of potential mechanotransducers in TrkA/C mice such as TWIK-related K⁺ channel (TRK), especially TRAAK (Kcnk4) (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). Knock-in TrkA/C mice are also characterised by a downregulation of acid-sensing ionic channels (ASICs), mainly ASIC3. ASIC3 has been involved in mechanical hypersensitivity in several types of pain models (Ikeuchi et al., 2008; E. Deval et al., 2011; Kathleen A Sluka et al., 2013; Hsieh et al., 2017) and its expression is particularly regulated by TrkA transduction pathways such as p38 MAPK and c-Jun (Mamet, Lazdunski and Voilley, 2003; Chaumette et al., 2018). Strikingly, a specific decrease of c-Jun RNA expression in monoarthritic TrkA/C mice compared to monoarthritic WT mice was observed, which extend our previous findings demonstrating a specific involvement of p38 MAPK and c-Jun signalling pathways in NGF-induced mechanical hypersensitivity in the post-surgical pain model (Chaumette et al., 2018). Interestingly, an increase of c-Jun N-terminal kinase (JNK) expression, which is upstream of c-Jun, is associated with an increase of cellular matrix degradation (e.g. MMP3) that ultimately results in joint destruction (Han *et al.*, 2001, 2002). Moreover, c-Jun is involved in RANKL-induced osteoclast differentiation (Ikeda *et al.*, 2004). Taken together, these results suggest that the decrease of c-Jun signalling pathways in TrkA/C mice could be directly involved in the lack of mechanical hypersensitivity development, probably *via* ASIC3, and potentially in bone remodelling. A direct link between both is also plausible. Indeed, it has been already showed that increase osteoclast activity is associated with a rise of acidic pH microenvironment (Jimenez-Andrade *et al.*, 2010), which could sensitise ASIC3 channel expressed in joint nociceptors.

To conclude, we have demonstrated a specific involvement of TrkA signalling pathways in mechanical hypersensitivity development and in bone erosion/remodelling following arthritis. Beyond the involvement of nerve sprouting, mechanical hypersensitivity seems to be dependant of some specific transcriptional changes in the expression of neurotransmitters and putative mechanotransducers. We further highlighted a possible involvement of c-Jun signalling both in pain development and bone remodelling/erosion. Further investigations are needed to clarify the precise role of c-Jun transduction pathways on joint remodelling and associated pain in arthritis.

Bibliography

Aletaha, D., Funovits, J. and Smolen, J. S. (2011) 'Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction.', *Annals of the rheumatic diseases*. BMJ Publishing Group Ltd, 70(5), pp. 733–9. doi: 10.1136/ard.2010.138693.

Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noë, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A. and Lazdunski, M. (2006) 'TREK-1, a K þ channel involved in polymodal pain perception', *The EMBO Journal*, 25, pp. 2368–2376. doi: 10.1038/.

Aloe, L., Tuveri, M. A., Carcassi, U. and Levi-Montalcini, R. (1992) 'Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis', *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Inc., 35(3), pp. 351–355. doi: 10.1002/art.1780350315.

Altawil, R., Saevarsdottir, S., Wedrén, S., Alfredsson, L., Klareskog, L. and Lampa, J. (2016) 'Remaining Pain in Early Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Methotrexate', *Arthritis Care & Research*, 68(8), pp. 1061–1068. doi: 10.1002/acr.22790.

Asaumi, K., Nakanishi, T., Asahara, H., Inoue, H. and Takigawa, M. (2000) 'Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing', *Bone*, 26(6), pp. 625–633. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00281-7.

Ashraf, S., Bouhana, K. S., Pheneger, J., Andrews, S. W. and Walsh, D. A. (2016) 'Selective inhibition of tropomyosin-receptor-kinase A (TrkA) reduces pain and joint damage in two rat models of inflammatory arthritis.', *Arthritis research & therapy*, 18(1), p. 97. doi: 10.1186/s13075-016-0996-z.

Bannister, K., Kucharczyk, M. and Dickenson, A. H. (2017) 'Hopes for the Future of Pain Control', *Pain and Therapy*. Springer Healthcare, 6(2), pp. 117–128. doi: 10.1007/s40122-017-0073-6.

Bannwarth, B. and Kostine, M. (2014) 'Targeting Nerve Growth Factor (NGF) for Pain Management: What Does the Future Hold for NGF Antagonists?', *Drugs*. Springer International Publishing, 74(6), pp. 619–626. doi: 10.1007/s40265-014-0208-6.

Bannwarth, B. and Kostine, M. (2017) 'Nerve Growth Factor Antagonists: Is the Future of Monoclonal Antibodies Becoming Clearer?', *Drugs*. doi: 10.1007/s40265-017-0781-6.

Barthel, C., Yeremenko, N., Jacobs, R., Schmidt, R. E., Bernateck, M., Zeidler, H., Tak, P.-P., Baeten, D. and Rihl, M. (2009) 'Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis.', *Arthritis research & therapy*. BioMed Central, 11(3), p. R82. doi: 10.1186/ar2716.

Bennett, D. L., Koltzenburg, M., Priestley, J. V, Shelton, D. L. and McMahon, S. B. (1998) 'Endogenous nerve growth factor regulates the sensitivity of nociceptors in the adult rat.', *The European journal of neuroscience*, 10(4), pp. 1282–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749782 (Accessed: 18 July 2017).

Bergmann, I., Reiter, R., Toyka, K. V and Koltzenburg, M. (1998) 'Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75.', *Neuroscience letters*, 255(2), pp. 87–90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835221 (Accessed: 28 June 2018).

Buchbender, C., Ostendorf, B., Mattes-György, K., Miese, F., Wittsack, H.-J., Quentin, M., Specker, C., Schneider, M., Antoch, G., Müller, H.-W. and Scherer, A. (2012) 'Synovitis and bone inflammation in early rheumatoid arthritis: high-resolution multi-pinhole SPECT versus MRI.', *Diagnostic and interventional radiology (Ankara, Turkey)*, 19(1), pp. 20–4. doi: 10.4261/1305-3825.DIR.5922-12.1.

Calabrò, A., Caterino, A. L., Elefante, E., Valentini, V., Vitale, A., Talarico, R., Cantarini, L. and

Frediani, B. (2016) 'One year in review 2016: Novelties in the treatment of rheumatoid arthritis', *Clinical and Experimental Rheumatology*, pp. 357–372. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268779 (Accessed: 1 August 2017).

Castañeda-Corral, G., Jimenez-Andrade, J. M., Bloom, A. P., Taylor, R. N., Mantyh, W. G., Kaczmarska, M. J., Ghilardi, J. R. and Mantyh, P. W. (2011) 'The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A', *Neuroscience*, 178, pp. 196–207. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.01.039.

Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I. and Anderson, D. J. (2009) 'Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), pp. 9075–80. doi: 10.1073/pnas.0901507106.

Chang, D. S., Hsu, E., Hottinger, D. G. and Cohen, S. P. (2016) 'Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence.', *Journal of pain research*. Dove Press, 9, pp. 373–83. doi: 10.2147/JPR.S89061.

Chao, M. V (2003) 'Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.', *Nature reviews. Neuroscience*, 4(4), pp. 299–309. doi: 10.1038/nrn1078.

Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. and Yaksh, T. L. (1994) 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw', *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

Chaumette, T., Delay, L., Barbier, J., Boudieu, L., Aissouni, Y., Lashermes, A., Legha, W., Antraigue, S., Carvalho, F., Eschalier, A., Ardid, D., Moqrich, A. and Marchand, F. (2018) 'c-Jun / p38MAPK / ASIC3 pathways activated by NGF through TrkA is essential for mechanical allosynia development following somatic injury and to a lesser extent visceral injury', *unpublished*.

Chillingworth, N. L. and Donaldson, L. F. (2003) 'Characterisation of a Freund's complete adjuvantinduced model of chronic arthritis in mice.', *Journal of neuroscience methods*, 128(1–2), pp. 45–52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948547 (Accessed: 21 September 2018).

Cho, H., Yang, Y. D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S. K., Na, H. S., Harfe, B. D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J. N. and Oh, U. (2012) 'The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons', *Nature Neuroscience*, 15(7), pp. 1015–1021. doi: 10.1038/nn.3111.

Colebatch, A. N., Edwards, C. J., Østergaard, M., van der Heijde, D., Balint, P. V, D'Agostino, M.-A., Forslind, K., Grassi, W., Haavardsholm, E. A., Haugeberg, G., Jurik, A.-G., Landewé, R. B., Naredo, E., O'Connor, P. J., Ostendorf, B., Potočki, K., Schmidt, W. A., Smolen, J. S., Sokolovic, S., Watt, I. and Conaghan, P. G. (2013) 'EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(6), pp. 804–814. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203158.

van Dam, E. A., van der Harst, J. E., ter Braak, C. J. F., Tegelenbosch, R. A. J., Spruijt, B. M. and Noldus, L. P. J. J. (2013) 'An automated system for the recognition of various specific rat behaviours.', *Journal of neuroscience methods*, 218(2), pp. 214–24. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.05.012.

Delmas, P., Hao, J. and Rodat-Despoix, L. (2011) 'Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 12(3), pp. 139–153. doi: 10.1038/nrn2993.

Deval, E., Noel, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M. and Lingueglia, E. (2011) 'Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain', *Journal of Neuroscience*, 31(16),

pp. 6059-6066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5266-10.2011.

Dixon, W. J. (1980) 'Efficient Analysis of Experimental Observations', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20(1), pp. 441–462. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.

Garip, Y., ESER, F., KILIÇARSLAN, A. and BODUR, H. (2015) 'Prevalence of Neuropathic Pain in Rheumatic Disorders: Association With Disease Activity, Functional Status and Quality of Life', *Archives of Rheumatology*. Turkish League Against Rheumatism, 30(3), pp. 231–237. doi: 10.5606/ArchRheumatol.2015.5295.

Gauldie, S. D., McQueen, D. S., Clarke, C. J. and Chessell, I. P. (2004) 'A robust model of adjuvantinduced chronic unilateral arthritis in two mouse strains.', *Journal of neuroscience methods*, 139(2), pp. 281–91. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.003.

Ghilardi, J. R., Freeman, K. T., Jimenez-Andrade, J. M., Coughlin, K. A., Kaczmarska, M. J., Castaneda-Corral, G., Bloom, A. P., Kuskowski, M. A. and Mantyh, P. W. (2012) 'Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint.', *Arthritis and rheumatism*, 64(7), pp. 2223–32. doi: 10.1002/art.34385.

Gorokhova, S., Gaillard, S., Urien, L., Malapert, P., Legha, W., Baronian, G., Desvignes, J.-P., Alonso, S. and Moqrich, A. (2014) 'Uncoupling of molecular maturation from peripheral target innervation in nociceptors expressing a chimeric TrkA/TrkC receptor.', *PLoS genetics*. Public Library of Science, 10(2), p. e1004081. doi: 10.1371/journal.pgen.1004081.

Han, Z., Boyle, D. L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A. M. and Firestein, G. S. (2001) 'c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis', *Journal of Clinical Investigation*, 108(1), pp. 73–81. doi: 10.1172/JCI12466.

Han, Z., Chang, L., Yamanishi, Y., Karin, M. and Firestein, G. S. (2002) 'Joint damage and inflammation in c-Jun N-terminal kinase 2 knockout mice with passive murine collagen-induced arthritis', *Arthritis* & *Rheumatism*, 46(3), pp. 818–823. doi: 10.1002/art.10104.

Heiberg, T. and Kvien, T. K. (2002) 'Preferences for improved health examined in 1,024 patients with rheumatoid arthritis: pain has highest priority.', *Arthritis and rheumatism*, 47(4), pp. 391–7. doi: 10.1002/art.10515.

Hirth, M., Rukwied, R., Gromann, A., Turnquist, B., Weinkauf, B., Francke, K., Albrecht, P., Rice, F., Hägglöf, B., Ringkamp, M., Engelhardt, M., Schultz, C., Schmelz, M. and Obreja, O. (2013) 'Nerve growth factor induces sensitization of nociceptors without evidence for increased intraepidermal nerve fiber density.', *Pain*, 154(11), pp. 2500–11. doi: 10.1016/j.pain.2013.07.036.

Hochberg, M. C. (2015) 'Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of antinerve growth factor monoclonal antibodies.', *Osteoarthritis and cartilage*, 23 Suppl 1, pp. S18-21. doi: 10.1016/j.joca.2014.10.005.

Hsieh, W.-S., Kung, C.-C., Huang, S.-L., Lin, S.-C. and Sun, W.-H. (2017) 'TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 8870. doi: 10.1038/s41598-017-09200-6.

Huang, J., Zhang, X. and McNaughton, P. A. (2006) 'Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia.', *Current neuropharmacology*. Bentham Science Publishers, 4(3), pp. 197–206. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615146 (Accessed: 7 August 2018).

Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J., Reddy, S. V, Hata, K., Yamashita, K., Hiraga, T., Watanabe, T., Kukita, T., Yoshioka, K., Rao, A. and Yoneda, T. (2004) 'Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation.', *The*

Journal of clinical investigation, 114(4), pp. 475-84. doi: 10.1172/JCI19657.

Ikeuchi, M., Kolker, S. J., Burnes, L. A., Walder, R. Y. and Sluka, K. A. (2008) 'Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice.', *Pain*, 137(3), pp. 662–9. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.020.

Jimenez-Andrade, J. M., Mantyh, W. G., Bloom, A. P., Ferng, A. S., Geffre, C. P. and Mantyh, P. W. (2010) 'Bone cancer pain', *Annals of the New York Academy of Sciences*. Wiley/Blackwell (10.1111), 1198(1), pp. 173–181. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05429.x.

Katz, N., Borenstein, D. G., Birbara, C., Bramson, C., Nemeth, M. A., Smith, M. D. and Brown, M. T. (2011) 'Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of chronic low back pain', *Pain*, 152(10), pp. 2248–2258. doi: 10.1016/j.pain.2011.05.003.

Kerr, B. J., Bradbury, E. J., Bennett, D. L., Trivedi, P. M., Dassan, P., French, J., Shelton, D. B., McMahon, S. B. and Thompson, S. W. (1999) 'Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(12), pp. 5138–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366647 (Accessed: 15 August 2018).

Khairnar, A., Marchand, F., Vidal, A., Etienne, M., Miladi, I., Auzeloux, P., Cachin, F., Eschalier, A., Chezal, J.-M., Ardid, D. and Miot-Noirault, E. (2015) '99mTc-NTP 15-5 Imaging for Cartilage Involvement in Experimental Rheumatoid Arthritis: Comparison with Routinely Used Molecular Imaging Methods and Sensitivity to Chronic Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Treatment', *Journal of Nuclear Medicine*, 56(5), pp. 798–804. doi: 10.2967/jnumed.114.151415.

Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W. D. and Barbacid, M. (1994) 'Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates la muscle afferents and results in abnormal movements', *Nature*. Nature Publishing Group, 368(6468), pp. 249–251. doi: 10.1038/368249a0.

Lane, N. E. and Corr, M. (2017) 'Osteoarthritis in 2016: Anti-NGF treatments for pain - two steps forward, one step back?', *Nature reviews. Rheumatology*, 13(2), pp. 76–78. doi: 10.1038/nrrheum.2016.224.

Lane, N. E., Schnitzer, T. J., Birbara, C. A., Mokhtarani, M., Shelton, D. L., Smith, M. D. and Brown, M. T. (2010) 'Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 363(16), pp. 1521–1531. doi: 10.1056/NEJMoa0901510.

Latremoliere, A. and Woolf, C. J. (2009) 'Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.', *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. NIH Public Access, 10(9), pp. 895–926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.

Lee, B., Cho, H., Jung, J., Yang, Y. D., Yang, D.-J. and Oh, U. (2014) 'Anoctamin 1 Contributes to Inflammatory and Nerve-Injury Induced Hypersensitivity', *Molecular Pain*, 10, pp. 1744-8069-10–5. doi: 10.1186/1744-8069-10-5.

Lee, Y. C., Cui, J., Lu, B., Frits, M. L., Iannaccone, C. K., Shadick, N. A., Weinblatt, M. E. and Solomon, D. H. (2011) 'Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: a longitudinal observational study', *Arthritis Research & Therapy*, 13(3), p. R83. doi: 10.1186/ar3353.

Levi-Montalcini, R. (1987) 'The nerve growth factor: thirty-five years later.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 6(5), pp. 1145–54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3301324 (Accessed: 12 July 2017).

Lewin, G. R., Ritter, A. M. and Mendell, L. M. (1993) 'Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(5), pp. 2136–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478693 (Accessed: 1 August 2017).

Lewin, G. R., Rueff, A. and Mendell, L. M. (1994) 'Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia.', *The European journal of neuroscience*, 6(12), pp. 1903–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7704300 (Accessed: 19 July 2018).

Lolignier, S., Amsalem, M., Maingret, F., Padilla, F., Gabriac, M., Chapuy, E., Eschalier, A., Delmas, P. and Busserolles, J. (2011) 'Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation', *PLoS ONE*. Edited by S. Barnes, 6(8), p. e23083. doi: 10.1371/journal.pone.0023083.

Longo, G., Osikowicz, M. and Ribeiro-da-Silva, A. (2013) 'Sympathetic Fiber Sprouting in Inflamed Joints and Adjacent Skin Contributes to Pain-Related Behavior in Arthritis', *Journal of Neuroscience*, 33(24), pp. 10066–10074. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5784-12.2013.

Mamet, J., Lazdunski, M. and Voilley, N. (2003) 'How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons.', *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp. 48907–13. doi: 10.1074/jbc.M309468200.

Mantyh, P. W. (2014) 'The neurobiology of skeletal pain.', *The European journal of neuroscience*. NIH Public Access, 39(3), pp. 508–19. doi: 10.1111/ejn.12462.

Mantyh, P. W. (2014) 'The neurobiology of skeletal pain', *European Journal of Neuroscience*, 39(3), pp. 508–519. doi: 10.1111/ejn.12462.

Mantyh, P. W., Koltzenburg, M., Mendell, L. M., Tive, L. and Shelton, D. L. (2011) 'Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain.', *Anesthesiology*, 115(1), pp. 189–204. doi: 10.1097/ALN.0b013e31821b1ac5.

McWilliams, D. F. and Walsh, D. A. (2017) 'Pain mechanisms in rheumatoid arthritis.', *Clinical and experimental rheumatology*, 35 Suppl 1(5), pp. 94–101. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28967354 (Accessed: 3 July 2018).

Miller, F. D. and Kaplan, D. R. (2001) 'On Trk for retrograde signaling.', *Neuron*, 32(5), pp. 767–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738023 (Accessed: 29 May 2018).

Miot-Noirault, E., Vidal, A., Pastoureau, P., Bonafous, J., Chomel, A., Sarry, L., Audin, L., Madelmont, J.-C. and Moins, N. (2007) 'Early detection and monitoring of cartilage alteration in the experimental meniscectomised guinea pig model of osteoarthritis by 99mTc-NTP 15-5 scintigraphy', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 34(8), pp. 1280–1290. doi: 10.1007/s00259-006-0320-2.

Nencini, S., Ringuet, M., Kim, D.-H., Chen, Y.-J., Greenhill, C. and Ivanusic, J. J. (2017) 'Mechanisms of nerve growth factor signaling in bone nociceptors and in an animal model of inflammatory bone pain', *Molecular Pain*, 13, p. 174480691769701. doi: 10.1177/1744806917697011.

Nicol, G. D. and Vasko, M. R. (2007) 'Unraveling the Story of NGF-mediated Sensitization of Nociceptive Sensory Neurons: ON or OFF the Trks?', *Molecular Interventions*, 7(1), pp. 26–41. doi: 10.1124/mi.7.1.6.

Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A. and Lazdunski, M. (2009) 'The mechano-activated K+ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception', *The EMBO Journal*, 28(9), pp. 1308–1318. doi:

10.1038/emboj.2009.57.

Nwosu, L. N., Mapp, P. I., Chapman, V. and Walsh, D. A. (2016) 'Blocking the tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor inhibits pain behaviour in two rat models of osteoarthritis.', *Annals of the rheumatic diseases*, 75(6), pp. 1246–54. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207203.

Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1993) 'Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex.', *The Journal of biological chemistry*, 268(31), pp. 22963–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226808 (Accessed: 20 July 2018).

Omerbašić, D., Smith, E. S. J., Moroni, M., Homfeld, J., Eigenbrod, O., Bennett, N. C., Reznick, J., Faulkes, C. G., Selbach, M. and Lewin, G. R. (2016) 'Hypofunctional TrkA Accounts for the Absence of Pain Sensitization in the African Naked Mole-Rat.', *Cell reports*, 17(3), pp. 748–758. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.035.

Pap, T. and Korb-Pap, A. (2015) 'Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis--two unequal siblings.', *Nature reviews. Rheumatology*, 11(10), pp. 606–15. doi: 10.1038/nrrheum.2015.95.

Park, T. J., Lu, Y., Jüttner, R., Smith, E. S. J., Hu, J., Brand, A., Wetzel, C., Milenkovic, N., Erdmann, B., Heppenstall, P. A., Laurito, C. E., Wilson, S. P. and Lewin, G. R. (2008) 'Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (Heterocephalus glaber).', *PLoS biology*. Edited by A. I. Basbaum, 6(1), p. e13. doi: 10.1371/journal.pbio.0060013.

Perrot, S., Dieudé, P., Pérocheau, D. and Allanore, Y. (2013) 'Comparison of pain, pain burden, coping strategies, and attitudes between patients with systemic sclerosis and patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study.', *Pain medicine (Malden, Mass.)*, 14(11), pp. 1776–85. doi: 10.1111/pme.12213.

Pezet, S. and McMahon, S. B. (2006) 'NEUROTROPHINS: Mediators and Modulators of Pain', *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), pp. 507–538. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929.

Prato, V., Taberner, F. J., Hockley, J. R. F., Callejo, G., Arcourt, A., Tazir, B., Hammer, L., Schad, P., Heppenstall, P. A., Smith, E. S. and Lechner, S. G. (2017) 'Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive "Silent" Nociceptors.', *Cell reports*, 21(11), pp. 3102–3115. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.066.

Raychaudhuri, S. P., Raychaudhuri, S. K., Atkuri, K. R., Herzenberg, L. A. and Herzenberg, L. A. (2011) 'Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis', *Arthritis & Rheumatism*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 63(11), pp. 3243–3252. doi: 10.1002/art.30564.

Sang, X.-G., Wang, Z.-Y., Cheng, L., Liu, Y.-H., Li, Y.-G., Qin, T. and Di, K. (2017) 'Analysis of the mechanism by which nerve growth factor promotes callus formation in mice with tibial fracture.', *Experimental and therapeutic medicine*. Spandidos Publications, 13(4), pp. 1376–1380. doi: 10.3892/etm.2017.4108.

Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. B. and Aigner, T. (2010) 'Basic methods in histopathology of joint tissues', *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders, 18, pp. S113–S116. doi: 10.1016/J.JOCA.2010.05.026.

Shelton, D. L., Zeller, J., Ho, W.-H., Pons, J. and Rosenthal, A. (2005) 'Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis.', *Pain*, 116(1–2), pp. 8–16. doi: 10.1016/j.pain.2005.03.039.

Shu, X. and Mendell, L. M. (1999) 'Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat

sensory neurons to capsaicin.', *Neuroscience letters*, 274(3), pp. 159–62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548414 (Accessed: 2 August 2018).

Sluka, K. A., Rasmussen, L. A., Edgar, M. M., O'Donnell, J. M., Walder, R. Y., Kolker, S. J., Boyle, D. L. and Firestein, G. S. (2013) 'Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis.', *Arthritis and rheumatism*, 65(5), pp. 1194–202. doi: 10.1002/art.37862.

Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V. and Yamamoto, K. (2018) 'Rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Disease Primers*, 4, p. 18001. doi: 10.1038/nrdp.2018.1.

Taylor, P., Manger, B., Alvaro-Gracia, J., Johnstone, R., Gomez-Reino, J., Eberhardt, E., Wolfe, F., Schwartzman, S., Furfaro, N. and Kavanaugh, A. (2010) 'Patient Perceptions concerning Pain Management in the Treatment of Rheumatoid Arthritis', *Journal of International Medical Research*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 38(4), pp. 1213–1224. doi: 10.1177/147323001003800402.

Tekieh, E., Zaringhalam, J., Manaheji, H., Maghsoudi, N., Alani, B. and Zardooz, H. (2011) 'Increased serum IL-6 level time-dependently regulates hyperalgesia and spinal mu opioid receptor expression during CFA-induced arthritis.', *EXCLI journal*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, 10, pp. 23–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27857662 (Accessed: 21 September 2018).

Tomlinson, R. E., Li, Z., Zhang, Q., Goh, B. C., Li, Z., Thorek, D. L. J., Rajbhandari, L., Brushart, T. M., Minichiello, L., Zhou, F., Venkatesan, A. and Clemens, T. L. (2016) 'NGF-TrkA signaling by sensory nerves coordinates the vascularization and ossification of developing endochondral bone HHS Public Access Graphical Abstract', *September*, 6(1610), pp. 2723–2735. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.002.

Velot, E. (2011) 'Evaluation de différentes solutions de décalcification pour l'étude du cartilage: compatibilité avec les techniques d'histologie, d'immunohistochimie et d'hybridation in situ', *Revue française d'histotechnologie (Amboise)*. Association française d'histotechnologie, 24(1), pp. 115–127. Available at: http://www.refdoc.fr/Detailnotice?idarticle (Accessed: 21 December 2017).

Wang, L., Zhou, S., Liu, B., Lei, D., Zhao, Y., Lu, C. and Tan, A. (2006) 'Locally applied nerve growth factor enhances bone consolidation in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis.', *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 24(12), pp. 2238–45. doi: 10.1002/jor.20269.

Westlund, K. N. (2006) 'Chapter 9 The dorsal horn and hyperalgesia.', *Handbook of clinical neurology*. NIH Public Access, 81, pp. 103–25. doi: 10.1016/S0072-9752(06)80013-8.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, Conseil Régional Auvergne-Rhône-Alpes (project: "Ressourcement S3", Arth-Innov) and Feder as well as the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

Article n°3

Article n°3

Anti-citrullinated protein autoantibodies induced pain-like behaviour and bone erosion – links to osteoclast activity and ASIC3-mediated sensitization

Jurczak A^{1*}, **Delay L**^{4*}, Barbier J⁴, Krock E¹, Wigerblad G², Sandor K¹, Rogóż K¹, Briat A⁵, Miot-Noirault E⁵, Martinez A³, Deval E^{6,7}, Jiménez-Andrade JM³, I. Catrina A², Klareskog L², Marchand F⁴, I. Svensson C^{1†}

I. Présentation de l'Article 3

La PR est une pathologie qui peut débuter des mois voire des années avant même le développement d'une synovite permettant son diagnostic (Catrina *et al.*, 2017). Ce stade préclinique est marqué par la production d'autoanticorps, en particulier des anticorps anti-protéines citrullinées ou ACPA (Kurki *et al.*, 1992; Nielen *et al.*, 2004; van de Stadt *et al.*, 2011). Dans cette phase non inflammatoire, certains patients peuvent présenter une arthralgie (van Baarsen *et al.*, 2013; de Hair *et al.*, 2014). L'équipe de Camilla Svensson au Karolinska Institute a pu mettre en évidence l'induction de symptômes douloureux chez la souris suite à l'injection systémique d'ACPA monoclonaux murinisés issus de cellules B isolées de patients PR (Amara *et al.*, 2013; Bas *et al.*, 2016). Les ACPA sont capables de se lier aux protéines citrullinées présentent au niveau des ostéoclastes et entraineraient la libération de CXCL1 (l'homologue murin de l'interleukine 8 humaine), elle-même capable de sensibiliser les nocicepteurs présents dans l'environnement articulaire (Krishnamurthy *et al.*, 2016; Wigerblad *et al.*, 2016). Mais, ce mécanisme n'est pas unique. En effet, la séquestration de cette interleukine par la réparixine entraine seulement une diminution partielle de la douleur induite par les ACPA. Nous pensons qu'un autre mécanisme d'activation des nocicepteurs est possible et son investigation fait l'objet de cet Article n°3.

Dans cette étude, nous avons évalué si les anticorps monoclonaux anti-protéines citrullinées associés à la PR présentant des spécificités d'épitopes citrullinés particulières, diffèrent dans leur capacité à induire une douleur et une érosion osseuse. En outre, nous avons émis l'hypothèse que les ACPA pourraient soit directement ou indirectement, *via* une diminution de pH ou le relargage de molécules intermédiaires tels que des lipides au niveau de l'os, activer les canaux ASIC3 présents au niveau des fibres afférentes nociceptives conduisant à leur sensibilisation et au développement d'une arthralgie.

Tout d'abord, nous avons confirmé que les sous-types monoclonaux IgG1 ACPA diffèrent par leurs propriétés pronociceptives et érosives de l'os certainement liées à leurs différentes réactivités envers les épitopes citrullinés présents sur différentes cibles, en particulier celles impliquant une activité ostéoclastique. Ainsi, la combinaison des clones B02/B09 d'ACPA induits, chez les souris injectées, le développement de symptômes douloureux (*i.e.* hypersensibilité mécanique et au froid) sans inflammation, mais associé à une altération de l'homéostasie osseuse marquée par une augmentation du remodelage osseux et de l'activité ostéoclastique. Les symptômes douloureux induits par les ACPA sont dépendants de l'activation des ostéoclastes et de l'activation des canaux ASIC3. L'activation des canaux ASIC3 par les ACPA se fait de manière indirecte. Nous ne savons pas encore si cette activation est effectivement due à une diminution de pH dans l'environnement articulaire et/ou si des molécules intermédiaires telles que des lipides sont libérés et activent ces canaux.

Article n°3

Anti-citrullinated protein autoantibodies induced pain-like behaviour and bone erosion – links to osteoclast activity and ASIC3-mediated sensitization

Jurczak A^{1*}, **Delay L**^{4*}, Barbier J⁴, Krock E¹, Wigerblad G², Sandor K¹, Rogóż K¹, Briat A⁵, Miot-Noirault E⁵, Martinez A³, Deval E^{6,7}, Jiménez-Andrade JM³, I. Catrina A², Klareskog L², Marchand F⁴, I. Svensson C^{1†}

¹Department of Physiology and Pharmacology

² Department of Medicine, Rheumatology Unit, Center of Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden,

³ Unidad Academica Multidisciplinaria Reynosa Aztlan, Universidad Autonoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, Mexico,

⁴ Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 Neuro-Dol, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France,

⁵ Université Clermont Auvergne, Inserm UMR 1240, IMoST, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Clermont-Ferrand, France.

⁶ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Valbonne, France.

⁷ LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Valbonne, France.

† Corresponding author: Dr Camilla I Svensson, Department of Physiology and Pharmacology,

Center for Molecular Medicine L8:02, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Tel: +46 8 524 87948 Email address: <u>camilla.svensson@ki.se</u>

*These authors contributed equally to the work

Abstract

Aim of Investigation

Joint pain is one of the most debilitating symptoms of rheumatoid arthritis (RA). We previously demonstrated that transferring ACPA IgG purified from RA patients to mice induces pain-like behaviour and bone erosion. Our aim was to investigate if monoclonal RA-associated antibodies (mAbs) with particular epitope specificities differ in their abilities to induce pain and bone-erosion.

Methods

1103:01B02, 1325:01B09, 1276:01D10 and 1276:01G09 (control IgG) mAbs generated from RA patients were injected alone or in combination (B02/B09, B02/D10) in mice. Mechanical hypersensitivity and cold allodynia were assessed. Inflammatory, cartilage and bone-remodelling changes in joints were evaluated using *in vivo* imaging. ASIC3 and TRPV1 expression were investigated in lumbar DRGs. B02/B09-injected mice were treated with naproxen (50mg/kg), acetaminophen (200mg/kg) and morphine (3mg/kg) as well as zoledronic acid (100µg/kg), a bisphosphonate, and T06, a specific CathK inhibitor. As enhanced osteoclastogenesis is often accompanied by acidification, we investigated the involvement of ASIC3 using pharmacological and genetic approaches.

Results

mAbs with particular epitope specificities differ in their abilities to induce pain-like behaviour and bone-erosion with B02/B09 combination having the most potent pro-nociceptive and bone erosive effect. This effect was not associated with inflammation but with an increase of ASIC3 and TRPV1 expression in DRGs neurones. Pain induced by B02/B09 was not attenuated by naproxen or acetaminophen but was reversed by morphine and buprenorphine. Zoledronic acid and T06 also prevented the development of B02/B09 induced mechanical hypersensitivity. Finally, B02/B09 pronociceptive effect was inhibited by APETx2 and in ASIC3 KO mice.

Conclusions

We confirmed that monoclonal ACPA IgG1 subtypes differ in their pronociceptive and bone erosive properties certainly link to their reactivity patterns against citrullinated epitopes on different targets especially those engaging osteoclast activity. We suggest that as a result of ACPA-induced osteoclast activation, certain factors (*e.g.* protons) are released, which sensitize ASIC3, ultimately leading to pain.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease affecting around 1% people worldwide with joint pain as one of the main symptoms (WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium, 2003). Intriguingly, chronic pain associated with RA is frequently disconnected from the inflammatory state. Joint pain (arthralgia) often develops before signs of joint inflammation and is one of the first marks of an emerging RA (van Baarsen et al., 2013; de Hair et al., 2014). In established RA, despite reduced disease activity in response to treatment, a significant proportion of patients still complain from moderate to severe pain and a majority rate their pain management has unsatisfactory (Taylor et al., 2010). Autoantibodies frequently occur in the preclinical phase of the disease and can be detected months to years prior to RA diagnosis (Aho et al., 1985; del Puente et al., 1988; Kurki et al., 1992; Rantapää-Dahlqvist et al., 2003; Nielen et al., 2004; Shi et al., 2013). Among autoantibodies, anti-citrullinated protein autoantibodies (ACPA) are present in a major subset of RA patients (around 60-70%) (van Zanten et al., 2017) and are clinically used as serological markers for RA diagnosis (Aletaha et al., 2010). Often associated with arthralgia before the onset of inflammation, ACPA are a prognostic factor of a more aggressive RA following clinical diagnosis (Sokolove and Pisetsky, 2016). Importantly, we have recently demonstrated that a single injection of human IgG ACPA or monoclonal murinised IgG ACPA antibodies isolated from RA patients are capable of initiating pain when injected in rodent (Wigerblad et al., 2016). This effect of ACPA does not seem to be associated with any classical signs of inflammation in vivo but coupled with osteoclasts activation, at least in vitro, which via the release of a chemokine, CXCL1 (analogue to human IL-8), could mediate their pronociceptive effect (Krishnamurthy et al., 2016; Wigerblad et al., 2016). However, this mechanism involving CXCL1, is unlikely to be unique in contrast to the prime mechanism of osteoclast activation. Indeed, bone erosion may occur despite the disease being inactive and even in the absence of detectable inflammation in the joints of ACPA-positive patients at risk of developing RA (Molenaar et al., 2004; Kleyer et al., 2014). Thus, bone remodelling, particularly increased osteoclastic activity, can play a pivotal role in ACPA-induced pain. We hypothesized that joint bone erosion induced by ACPA, through osteoclast activation, arise in vivo and lead to a local release of protons and/or others factors, for instance lipids, in the bone microenvironment which in

turn may activate acid sensing ion channels (ASICs), particularly ASIC3, on nociceptive joint afferents, ultimately leading to pain.

ASIC3 channels are members of the ASICs family which are voltage-independent cation channels activated by extracellular acidification and widely expressed by nociceptors (Deval and Lingueglia, 2015). ASIC3 are activated by mild pH variation between 6.5 and 7.2-7.3 and has been involved in several types of pain models such as inflammatory models and acid induced pain (Deval *et al.*, 2008; Ikeuchi *et al.*, 2008; Izumi *et al.*, 2012a; Kathleen A. Sluka *et al.*, 2013; Sugimura *et al.*, 2015). Importantly, ASIC3 seems to be an important contributor of bone cancer pain (Deval and Lingueglia, 2015; Hiasa *et al.*, 2017). Some studies have even suggested that ASIC3 might play a direct role in osteoclast activity and bone remodelling (Yoneda *et al.*, 2015; Hanaka *et al.*, 2018). Therefore, the aim of our study was to better understand and characterize *in vivo* bone remodelling, especially bone erosion following ACPA administration, and to investigate the involvement of ASIC3 channels in ACPA induced pain-like behaviour.

Methods

Animals

BalB/c AnNRj mice (10-12 weeks old) were purchased from Janvier labs (France and Swenden). BalB/c mice were housed in a temperature controlled room with a 12-hour light/dark cycle, with food and water *ad libithum*. C57bl/6j WT-littermates and ASIC3 knock-out mice were bred in our animal facility (UCA BSU, France) and housed such as the BalB/c. Only C57bl/6j WT-littermates and ASIC3 KO mice were used for experiments presented in figure 5, 6, 7 and 8. All procedures performed in France were approved by the local ethical committee (Comité Régional d'éthique en matière d'expérimentation animale Auvergne (CEMEA-Auvergne)) and in accordance with European Communities Council Directive for the care of laboratory animals (86/609/EEC). All experiments performed in Sweden were also approved by the local ethics committee for animal experiments (Stockholm Norra Djurförsöksetiska nämnd). All experiments followed guidelines of the International Association for the Study of Pain and ARRIVE (Zimmermann, 1983; Rice *et al.*, 2008). Monoclonal antibodies (mAbs) 1103:01B02, 1325:01B09, 1276:01D10 and1276:01G09 (control mAb) were generated from CD19⁺ B cells sorted from RA patients (Amara *et al.*, 2013). Each mAb was injected intravenously alone (2mg) or in combination (B02/D10 and B02/B09; 1mg each).

Pain behaviours

Cold allodynia

Cold allodynia was assessed using the acetone test. A syringe filled with acetone was raised to the mouse's hind paw from below the mesh floor and an acetone drop was applied on the plantar surface of the paw. The duration of paw withdrawal, paw shaking, licking, biting in the 60 seconds immediately following acetone application was measured. Mice were tested 3 times per each paw with an inter-stimulation period of 10 minutes per mouse, altering paws between stimulations.

Clinical score

The development of potential inflammatory arthritis was evaluated by a quantitative visual scoring using a scale of 15 per paw as previously described (Bas *et al.*, 2012). One point was given by

swelling toes (5 in total), 5 points for the swelling of the plantar surface of the paw and 5 points for the swelling of the tibio-tarsal joint, yielding a maximum score of 15 per paw and 60 per mouse.

Assessment of mechanical allodynia

Paw mechanical sensitivity in B02/B09 pain model was assessed using von Frey's hairs based on the up-down method developed by (S R Chaplan et al., 1994) and modified by Dixon (Dixon, 1980). In France, von Frey's hairs used were: 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4 g for BalB/c and 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4 g for ASIC3 KO and WT-littermates. In Sweden, von Frey optiHair (Marstock OptiHair) was used with a logarithmically incremental stiffness of 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mN (converted to 0.051, 0.102, 0.204, 0.408, 0.815, 1.63 and 3.26 g respectively). Animals were acclimatised for at least 1h in individual clear acrylic cubicle $(22 \times 16.5 \times 14 \text{ cm})$ placed on the top of an elevated wire mesh. The filaments were applied on the right and left hind paws with a 5 min interval between stimuli and alternatively on each paw. Quick withdrawal or licking of the paw to the stimulus was considered a positive response. The first stimulus was one application of the middle von Frey filament (*i.e.* 0.6 or 0.16 or 0.408 g) and then stimuli were applied using the up and down method. Threshold values were derived according to the method described by (S R Chaplan et al., 1994). If the animal showed no response to the highest von Frey hair, the von Frey threshold of 4 or 1.4 or 3.26 g was assigned. If the animal showed response to all von Frey hairs, the von Frey threshold of 0.07 or 0.02 or 0.051 g was assigned. The 50% paw mechanical threshold was evaluated before and at different time points (see pharmacological experiments) after control mAb, PBS or mAb alone or in combination.

Assessment of thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed following the administration of control mAb, D10, B09, B02 alone or in combination using the plantar test as previously described by (Hargreaves *et al.*, 1988). Each animal was placed in a clear acrylic cubicle (22 × 16.5 × 14 cm) on top of a glass floor in a temperature controlled room (~22°C) and allowed to acclimatise for 1h before testing. The left and right hind paws were stimulated alternatively with a radiant heat source (Bioseb, France) placed under the glass floor. Withdrawal latencies were averaged over three consecutive tests, at least 10 min

apart, in response to the thermal challenge from a calibrated radiant light source (output of 190 mW/cm2). A cut-off of 20 s was imposed to prevent any tissue damage.

Quantitative PCR in lumbar DRGs following B02/B09 administration

To investigate changes in the expression of ASIC3, TRPV1, CGRP, substance P, we performed quantitative PCR (q-PCR) on lumbar DRGs at day 14 after B02/B09 administration (n= 4-5 for each groups, *i.e.* WT and ASIC3 KO mice injected with B02/B09 or PBS) were terminally anaesthetised using pentobarbitone and ipsilateral and contralateral lumbar DRGs (L3, L4, L5) were quickly dissected out, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. Total RNA was extracted using Quick-RNA_MicroPrep kit (ZymoResearch, Epigenetics, USA) according to the manufacturer's protocol. The concentration of RNA was quantified using Take3 nucleic acid quantification plate (Epoch, BioTek, USA). Equal amounts of RNA from each sample were reverse transcribed in a volume of 20µl to produce cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's recommendation.

SYBR Green-based detection was carried out on a real-time PCR instrument (RealPlex, Eppendorf, GmBH) with thermal cycler conditions of: 95 °C for 3 min, followed by 50 cycles (95 °C for 15 s, 59 °C for 15 s and 72°C for 15s). In each experiment, samples were assayed in duplicate. Data were analysed using the threshold cycle (Ct) relative quantification method. Relative quantities (RQ) were determined using the equation: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. HPRT was used as housekeeping gene. Forward and reverse primers used are presented in Table 1.

Quantitative PCR in ankle joints of the hind paws following B02/B09 administration

Ankle joints of the hind paws were processed for gene expression analysis at day 14 post B02/B09 injection. Ankle joints were dissected out and trimmed as 6mm from ankle joint to tibia and paw. Following the removal of muscles and tendons, samples were flash frozen in liquid nitrogen and stored in -80° C until further processing. Joint tissues were pulverized with biopulveriser followed by RNA extraction with TRIzol using tissue lyser (30 Hz frequency for 2min with 2 cycles, QIAGEN). Total RNA was extracted according to manufacturer's protocol and reverse transcribed by real time quantitative PCR (Step one System, Applied Biosystem). Predeveloped and validated TaqMan

primers were used for CatK (cathepsin K; Mm00484039), Acp5 (acid phosphatase 5 (TRAP); Mm00475698_m1) and Tcirg1 (vacuolar H+-ATPase; Mm00469406_m1). cDNA samples were loaded in duplicates into 96-well microAmp Fast plates (Thermofischer) and normalized against housekeeping gene Rplp2 (Mm00782638_s1). Relative fold changes were calculated by the comparative Ct method (2-ΔΔCT).

DRG immunohistochemistry

At the end of the ASIC3 KO mice behavioural experiments, 5 animals in each group (B02/B09 or PBS) and genotype (*i.e.* WT and ASIC3 KO) were terminally anaesthetised using pentobarbitone and quickly perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). After perfusion, L3-L4-L5 left DRGs were excised, post-fixed 4h in the same perfusion fixative, cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 48h at 4°C, and then frozen in freezing tissue medium (O.C.T). Transverse DRG sections (10µm) were cut on cryostat, dried for 30 min at room temperature and then stored at -20°C before staining.

DRG sections were stained as follows: after 3 washes in PBS containing 0.3% triton X-100 and 1% BSA, sections were incubated overnight at room temperature in a humid chamber with primaries antibodies (Guinea pig anti-ASIC3, 1/200, #AB5927, Merck Millipore [France]; rabbit anti-TRPV1; 1/1000; ACC-030, Alomone Labs [Israel]; rat anti-substance P; 1/200, Ab7340, Abcam [UK]) diluted in PBS containing 0.3% triton X-100. Following 5 washes 5 min each in PBS, sections were then incubated with the appropriate secondary antibodies (goat anti-guinea pig 550 Dye light for ASIC3, 1/1000; donkey anti-rabbit Alexas 546 for TRPV1, 1/500; goat anti-rat Alexas 488 for substance P, 1/1000) in PBS + 0.3% triton X-100, 2h at room temperature. Sections were then washed 3 times in PBS and cover-slipped with fluorescent mounting medium (Dako).

Sections were visualised under a Nikon Eclipse Ni-E fluorescent microscope run with Nikon analysis software (NiS element). DRG neurons counts were performed by a blind experimenter on L3-L4-L5 DRGs (4-6 sections for each animal, n=5 per group).

Joint Elisa lipocalin-2

At day 36 following B02/B09 or PBS administration, 8 animals in each group were terminally anaesthetised using pentobarbitone. The right tibio-tarsal joint was excised and snap frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were then crush in liquid nitrogen with a pilar and mortar and subsequently homogenized in lysis buffer (137mM NaCl, 20mM TrisHCl, 1% NP40, 10% glycerol, 1mM PMSF, 10µg/mL aprotinin, 1µg/mL leupeptin, 0.5mM sodium vanadate) using a glass homogenizer. Homogenates were then centrifuged at 14,000 x g for 10min at 4°C and supernatants were collected. Whole cell lysates were next titrated to determine their protein concentrations using a BCA Protein Assay kit (Pierce, UK). Mouse Lipocalin-2 content, a marker of low grade inflammation, was measured using a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique according to the manufacturer's guidelines (DuoSet, # DY1857, R&D system, Minneapolis, USA). Samples were processed in triplicate and values were calculated from the standard curve.

In vivo imaging

MicroCT imaging

At day 28, 8-12 animals in each of the different ACPA groups (Naïve, mAb control, B02, B09, B02/D10 and B02/B09, n= 6-19 in each group) and genotype for ASIC3 KO experiment (*i.e.* WT and ASIC3 injected with B02/B09 or PBS, n=10-15 in each group) were terminally anaesthetised using pentobarbitone and quickly perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). The right leg was dissected out, skin and muscles were very carefully removed to avoid any bone damage and post fixed in the same perfusion fixative for at least 24h. Following 3 washes in PBS, the right leg was stored in 70% ethanol at 4°C until scanning.

Trabecular bone was analysed at thallus, calcaneus, proximal and distal tibia level. Cortical bone was evaluated at medial tibia level using a micro-computed tomography system (Skyscan 1272, Bruker, Belgium). The scanning process was performed according to the guidelines for microCT analysis for rodent bone structure. The scanning was made at a 10 µm voxel size with an X-ray power of 60 kVp and 166 µA with an integration time of 627 ms. Obtained images were reconstructed using

NRecon software (Bruker, Belgium). The trabecular region of interest (ROI) at proximal and distal tibia was evaluated by selecting 2 mm in the vertical axis, subsequent to 0.5 mm from the growth plate (reference point). For the cortical ROI analysis, sample level was selected a band of 1 mm thick at 4 mm distally from the growth plate. For the calcaneus analysis ROI was selected using a 0.5 mm² cylinder that was positioned 0.75 mm in vertical axis, subsequent to 0.5 mm from the beginning of the proximal calcaneus (reference point). The analysis of trabecular bone of the calcaneus was performed in the entire region that covers the bone. The CT analyser program (Bruker, Belgium) was used to determine trabecular bone parameters; an automatic segmentation algorithm (CT analyser) was applied in order to isolate the trabecular bone from the cortical bone. The parameters used for the trabecular bone were: trabecular bone volume ratio (BV/TV), trabecular separation (Tb.Sp), trabecular number (Tb.N). Cortical bone parameters in 3D were cortical thickness (Ct.Th) and 2D cross section bone area (Ct.Ar). Finally, hydroxyapatite calibration phantoms (250 and 750 mg/cm³) was used to calibrate trabecular and cortical bone density values (BMD).

Cathepsin K activity

Bone resorption was also assessed *in vivo* using an IVIS Spectrum small animal imaging system (Perkin Elmer) at day 21 following B02/B09 or PBS administration (n=5 in each group and for the ASIC3 KO experiment, n=5-10 in each group and genotype). Each mice received 2 nmol/100µl of Cat K 680 FASTTM (Perkin Elmer, France) by intravenous route. Six hours later, acquisition was performed under isoflurane anaesthesia (Isoflurane, 1.5%). Imaging was performed using the ex/em = 675/720 nm bandpass filters. Quantification analysis was performed with Living Image Software using fixed-sized rectangular ROI focused on hind paws (tibio-tarsal joint or knee) and results are presented as the total counts of radiant efficiency (radiance (photons per second per square centimeter per steradian) per incident excitation power (microwatt per square cm)).

2-DG imaging

Inflammation, marked by elevated glucose uptake in the inflamed tissue, was assessed *in vivo* using an IVIS Spectrum small animal imaging system (Perkin Elmer) at day 18 following B02/B09

or PBS administration (n=16 in each group). Each mice received 10 nmol/100µl of XenoLight RedIJect 2-DeoxyGlucosone (DG)-750 (Perkin Elmer, France) by intravenous administration. Three hours later, acquisition was performed under isoflurane anaesthesia (Isoflurane, 1%). Imaging was performed using the ex/em = 745/820 nm bandpass filters. Quantification analysis was performed with Living Image Software using ROI delineated on hind paws (tibio-tarsal joint). Results are presented as the total counts of radiant efficiency (radiance (photons per second per square centimeter per steradian) per incident excitation power (microwatt per square cm)).

Scintigraphic Imaging

For each radiotracer, the injected dose to each animal was determined by acquiring an image of the syringe before and after injection and counting using an activimeter (Capintec).

In order to evaluate cartilage remodelling, *in vivo* scintigraphic imaging was performed with N-[triethylammonium]-3-propyl-[15]ane-N5 (NTP 15-5) which was prepared and radiolabeled with ^{99m}Technetium as previously described, at day 2 and 28 following B02/B09 or PBS administration (n=8-11 for each group)(Amit Khairnar *et al.*, 2015). Planar acquisition (10min, 15% window at 140 keV) was performed 30 min after intravenous administration of 25 MBq of ^{99m}Tc-NTP 15-5. Quantitative analysis of scintigrams was performed with *Gammavision*+, with ROIs delineated over the front and hind paws and results are presented as the total counts in cpm in the ROI.

In order to evaluate bone remodelling, *in vivo* scintigraphic imaging was also performed in the same animals with the hydroxymethylene diphosphonate radiolabelled with ^{99m}Technetium (^{99m}Tc-HMDP) radiotracer at day 4 and 31 following B02/B09 or PBS administration (n=8-11 for each group). The bone imaging phase was acquired 2 hours and a half after intravenous injection of 10 MBq per mouse of the ^{99m}Tc-HMDP (Osteocys®, IBA). Planar acquisition was performed during 5 minutes (15% window at 140 keV) of the animal placed in ventral decubitus on a parallel collimator (20mm/1.8/0.2) of a gamma camera for small animal (γImager®, Biospace) under isoflurane anaesthesia (1%). Quantitative analysis of scintigrams was performed as described above and results are presented as the total counts in cpm in the ROI.

Pharmacological experiments

Effect of systemic naproxen, acetaminophen or morphine injection on mechanical allodynia following B02/B09 injection

Mechanical pain thresholds were assessed using von Frey test (up and down method). Seventeen days after B02/B09 or PBS injection, mice received either saline (*s.c.*) or morphine (3 mg/kg, *s.c.*), just after the baseline threshold measurement (n=8 for each group). Mechanical thresholds were assessed 30 and 60 min post-treatment. In order to reduce the number of animals used for this study, we allowed for one week of drugs wash out (*i.e.* twenty two days after B02/B09 or PBS injection), after which mice received either saline (*i.p.*) for the one previously treated with morphine, or acetaminophen (200 mg/kg, *i.p.*) for the one previously treated with saline, just after the baseline threshold measurement. Mechanical pain thresholds were then assessed at 45 min post injection. In another batch of animals, B02/B09 or PBS injected animals (n=8 for each group) received daily administration of naproxen (50mg/kg, *i.p.*) or saline during 3 consecutive days (12, 13, and 14 post mAb injection). Mechanical pain thresholds were assessed 180 min after each injection.

Effect of systemic zoledronic acid, and cathepsin K inhibitor (T06) administration on mechanical allodynia following B02/B09 injection

In order to investigate bone activation involvement in ACPA-induced pain, we used zoledronic acid, a bisphosphonate and T06, a specific inhibitor of cathepsin K enzyme (Panwar *et al.*, 2017). Following baseline mechanical pain threshold, mice received either PBS or B02/B09 administration. Zoledronic acid ($100\mu g/kg$) or saline was injected *i.p.* on days 1, 4, 7 and 10 post-B02/B09 injection and mechanical pain threshold were assessed on days 7, 12 and 14. Fresh ankle joints were dissected out on day 14 (n= 6 to 12 mice in each of the 3 different groups) and flash frozen in liquid nitrogen for subsequent q-PCR analysis of TRAP, Cat K and Tcirg1 mRNA expression.

Tanshinone IIA sulfonic sodium (T06, 40mg/kg) was resuspended in distilled water and given by oral gavage every day for the whole duration of the study (1-14 days post-B02/B09 injection) in 100µl/10g

body weight volume. Mechanical thresholds were tested on days 5, 7, 10, 12 and 14. Ankle joints were dissected on day 15 (n=6-8 per group) and processed as described above.

Effect of intra-articular APETx2, a specific ASIC3 blocker, on B02/B09-induced pain

Following baseline mechanical paw threshold before and at day 14 and 23 post B02/B09 or PBS administration, each mice was injected with 20µmol of APETx2 (Alomone Labs), a specific ASIC3 channel blocker, diluted in 10µl of saline, intra-articularly into the tibio-tarsal joint under 1.5-2% isoflurane anaesthesia. Mechanical allodynia was assessed using von Frey test (up and down method), before B02/B09 or PBS injection (*i.e.* baseline), 1h, 4h and 24h following intra-articular injection. All animals were injected into the right tibiotarsal joint with APETx2 and the contralateral joint, injected with saline, was used as an internal control (n=8 in each group). The experiment was done at day 14 and 23 following B02/B09 or PBS administration using the same animal following one week of drug wash-out.

Effect of B02/B09 administration in ASIC3 KO mice

In addition to the pharmacological approach, the involvement of ASIC3 in pain and bone remodelling induced by B02/B09 systemic administration was also investigated in ASIC3 KO strain. B02/B09 or PBS was administered as previously described in ASIC3 KO mice and WT littermates (n=26-29 animals in each group until day 14 and n=9-19 until day 28). Mechanical allodynia was assessed before (*i.e.* baseline), at day 7, 14, 20, 24 and 28 following B02/B09 or PBS. Arthritis score and weight of animals were recorded before and at day 5, 12, 20 and 26. Bone resorption was also assessed at day 21 using cathepsin K fluorescent imaging (n=5-10 in each group). Finally, half of the animals were sacrificed at day 14 or 28 post B02/B09 or PBS (n=10-12 for each group) for subsequent immunohistochemistry on DRGs and q-PCR on joint and DRGs (see above for methods). Finally, the right leg was also harvested at day 28 for microCT analysis as described above (n= 10-12 animals in each group).

Effect of B02/B09 administration on anxiety in ASIC3 KO mice

The elevated plus maze (EPM) consists of four arms, two opposite open arms (37 x 6 x 0.3 cm) and two opposite closed arms (37 x 6 x 15 cm), joined by a common central platform, subjected to an equal illumination (30 lux). The maze was elevated to 50 cm above the floor. Each animal was placed into the EPM facing an open arm. The time spent in open and closed arms as well as the number of entries into the open and closed arms (considered when head, gravity center and tail points are located within the arm) were automatically recorded for 5 min (Ethovision XT 13, Noldus). The time spent into the open arms and the number of entries into the open arms were calculated automatically for each animal. The EPM was performed at day 13 post-mAb injection in ASIC3 KO and WT littermates.

Electrophysiology

HEK293 cell cultures and transfection

HEK293 cell lines were grown as described previously (Ettaiche *et al.*, 2006). One day after plating, cells were transfected with pIRES2-sASIC3-EGFP or pIRES2-rASIC3a-EGFP vectors using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus transfection SA, Illkirch, France). Fluorescent cells were used for patch-clamp recordings 2–4 days after transfection.

Patch-clamp experiments

We used whole-cell configurations of the patch-clamp technique to measure membrane currents (voltage clamp). Recordings were made at room temperature using an axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) with a 2 kHz low-pass filter. Data were sampled at 10 kHz, digitized by a Digidata 1440 A-D/D-A converter (Axon Instruments) and recorded on a hard disk using pClamp software (version 10; Axon Instruments). For whole-cell experiments, the patch pipettes (2–8 MΩ) contained (in mM) the following: 135 KCl, 2.5 Na2-ATP, 2 MgCl2, 2.1 CaCl2, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.25 with KOH). The control bath solution contained (in mM) the following: 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl2, 2 CaCl2, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4 with N-methyl-D-glucamine or NaOH). ASIC

currents were induced by shifting one out of eight outlets of the microperfusion system from a holding control solution (*i.e.* pH 7.4) to an acidic test solution (*i.e.* pH 7.2). Whole-cell recording experiments were performed at -80 mV and acute application of B02 and B09 at 1 μ g/ml or LPC (bovine brain extract) at 10 μ M at resting pH 7.4 or application of B02 and B09 at 1 or 10 μ g/ml or LPC (bovine brain extract) at 10 μ M at pH 7.2 were made.

Statistics

All data are reported as mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Data were analysed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism version 6.00 and 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA) using analysis of variance (one or two way ANOVA) followed by Tukey or Bonferroni post-hoc tests for multiple comparisons as indicated in the figure legends or Student *t* test to compare two conditions. In all cases, the significance level was set at p<0.05.


Figure. 1: (**A**, **D**, **E**) Effect of a single i.v. injection of 2mg of D10 mAb (**A**), B02 mAb (**D**) and B09 mAb (**E**) compared to control mAb group on mechanical pain threshold using von Frey test (up and down method). (**I**, **J**) Effect of a single i.v. injection of 1mg each of the combination of D10/B02 mAbs (**I**) and B02/B09 mAbs (**J**) compared to control mAb group on mechanical pain threshold using von Frey test (up and down method). (**B**, **F**) Effect of a single i.v. injection of 2mg of D10 mAb (**B**) and B09 mAb (**F**) alone on cold allodynia measured at day 5 and 10 post mAb injection, respectively, compared to control mAb (**C**) alone on heat hyperalgesia measured at day 6 and 11 post mAb injection, respectively, compared to control mAb (**C**) group, using the thermal plantar test. (**H**, **K**) Clinical score of joint inflammation at different time points following mAbs administration alone (H) or in combination (**K**). n=6-8/group. Data are presented as mean ± SEM. **A**, **D**, **E**, **H**, **I**, **J**, **K**. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * p ≤ 0.05 compared to the control mAb group.

Results

Effect of different mAb injected alone or in combination on clinical score, mechanical allodynia, cold and heat hyperalgesia in mice

D10, B02 and B09 and control mAb (G09) cloned from single synovial B cells from human patients with RA were used alone (2mg) or in combination (1mg each). As previously described mAbs alone or in combination (Figure 1H&K) did not induced any obvious signs of joint inflammation with a clinical score of 0 during the all study for all groups. However, both D10 and B09 injected alone significantly increased mechanical sensitivity from day 4 to 10 and day 5 to 20, respectively, (Figure 1A&E) while B02 (Figure 1D) and control mAb (Figure 1A, D, E, I, J) did not. Cold response was also increased following D10 and B09 injection at day 5 and 10, respectively, compared to control mAb (Figure 1B&F). Interestingly, the administration of D10/B02 and to a far larger extent, B09/B02 combination (Figure 11&J) increased and prolonged mechanical hypersensitivity at day 8, 14, 25 and from day 7 up to 28, respectively, compared to D10 or B09 injected alone and the control mAb. These results suggest a potentiation of the duration and the pronociceptive effect of D10 and especially B09 when associated with B02. Finally, the administration of D10 and B09 alone did not cause heat hyperalgesia at day 6 and 11, respectively. Strong from these results, we decided to focus on the B02/B09 combination and to characterise and dissect out its pain mechanism.



Figure. 2: (**A**) Effect of repeated treatment of naproxen (50mg/kg, *i.p.*) or saline on three consecutive days (days 12, 13, 14 post-B02/B09 injection) on mechanical pain threshold using von Frey test (up and down method). n=3/group. (**B**) Effect of acute morphine (3 mg/kg, *s.c.*) or saline on day 17 post-B02/B09 injection on mechanical pain threshold using von Frey test (up and down method). (**C**) Effect of acute acetaminophen (200 mg/kg, *i.p.*) or saline on days 22 post-B02/B09 injection on mechanical pain threshold using von Frey test (up and down method). (**C**) Effect of acute acetaminophen (200 mg/kg, *i.p.*) or saline on days 22 post-B02/B09 injection on mechanical pain threshold using von Frey test (up and down method). n=8/group. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$ compared to the PBS group. ⁰⁰⁰ $p \le 0.001$ compared to the B02/B09 + saline group (**D**) Representative images of 2-DG fluorescent imaging in PBS (upper panel) or B02/B09-injected mice (lower panel). (**E**) Quantitative histogram of 2-DG fluorescence in the tibio-tarsal joints, measured *in vivo* 3 hours after i.v. injection of 2-DG-750 luminescent probe (100nmol/100µl) at day 18 post-B02/B09 or PBS injection; n=8-11/group; results are presented as total counts of radiant efficiency/incident excitation power. (**F**) Lipocalin-2 ankle joint contents measured by ELISA in the tibio-tarsal joint proteins homogenates on day 36 post-mAb injection, in the PBS and B02/B09 groups. n=8/group. Data presented as mean ± SEM. (**E**, **F**) Student *t* test between control PBS and B02/B09.

Effect of naproxen, acetaminophen and morphine on mechanical allodynia following B02/B09 administration

Administration of B02/B09 induced a significant decrease of paw mechanical threshold at day 14 or 21 compared to control mAb or PBS in the three different experiments as previously observed (**Figure 2A, B, C**). Saline administration in both B02/B09 and PBS groups did not change paw mechanical threshold (**Figure 2A, B, C**). Similarly, subchronic naproxen (50mg/kg, daily during 3 days) or acute acetaminophen (200 mg/kg) did not reduced mechanical allodynia at any time point in B02/B09 and PBS groups (**Figure 2A&B**). By contrast, systemic morphine administration at 3 mg/kg completely reversed mechanical allodynia at 30 and 60 min compared to B02/B09 saline treated group (**Figure 2C**). We did not observed any effect of morphine on paw mechanical threshold in the PBS group compared to PBS saline treated group.

Effect of B02/B09 on 2-DG joint imaging and lipocalin-2 joint content

No significant increase of 2-DG joint accumulation in the tibio-tarsal joint at day 18 following B02/B09 administration compared to the PBS control group was observed (**Figure 2D&E**). Ankle joint lipocalin-2 content at day 36 was also not different between B02/B09 and PBS groups (**Figure 2F**). Taken together, these results indicated a lack of inflammation following B02/B09 administration.



Figure. 3: (A) *In vivo* ^{99m}Tc-NTP SPECT imaging. Representative serial imaging in the same animal of each group (*i.e.* PBS or B02/B09) at day 2 and 28 following B02/B09 or PBS injection. (**B**) *In vivo* ^{99m}Tc-HMDP SPECT imaging. Representative serial imaging in the same animal of each group (*i.e.* PBS or B02/B09) at day 4 and 31 following B02/B09 or PBS injection. (**C**, **D**) Time course of ^{99m}Tc-NTP (**C**) and ^{99m}Tc-HMDP (**D**) activity (cpm) in PBS and B02/B09 groups. n=8-11/group. (**E**) Right panel. Representative images of cathepsin K fluorescent imaging in control (*i.e.* PBS, upper panel) and B02/B09 group (lower panel). (**E**) Left panel. Quantitative histogram of cathepsin K fluorescence in the tibio-tarsal joints, measured *in vivo* 6 hours after i.v. injection of Cat K 680 FASTTM luminescent probe (2 nmol/100µl) at day 21 post-mAb injection; n=8-11/group; results are presented as total counts of radiant efficiency/incident excitation power. Student *t* test between control PBS and B02/B09, * p ≤ 0.05 compared to the PBS control group. (**F**, **G**, **H**, **I**) Effect of different mAbs injected alone or in combination compared to naïve and control mAb groups on different bone parameters, quantified using micro-CT imaging: (**G**) trabecular bone volume (BV/TV), (**H**) trabecular number (Tb.N) and (**I**) trabecular separations (Tb.Sp.). n=6-19/group. Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 compared to control mAb group.

Effect of B02/B09 on cartilage and bone remodelling/erosion in mice

No increase in ^{99m}Tc-NTP accumulation within the ankle joint was observed at day 2 and 28 after B02/B09 administration, compared to PBS injection (**Figure 3A&C**), indicating a lack of *in vivo* cartilage remodelling. However, an increased accumulation of ^{99m}Tc-HMDP was observed as soon as day 4 up to day 31 after B02/B09 administration compared to PBS administration, suggesting increased bone remodelling (**Figure 3B&D**).

This result was reinforced by a significant increase of cathepsin K activity at day 21 after B02/B09 administration compared to the PBS group (**Figure 3E**, illustration and histogram). Finally, only the B02/B09 combination and not the others mAbs alone or B02/D10 combination, significantly reduced several bone microCT parameters: trabecular bone volume fraction, trabecular number and trabecular separation, compared to naive and control mAb groups (**Figure 3F, G, H, I**), indicating one erosion. Taken together, these results strongly support that the B02/B09 ACPA combination specifically induces bone remodelling and lead to bone erosion *in vivo*.



Figure. 4 : (**A**) Effect of repeated Zoledronate ($100\mu g/kg$, i.p.) administration on days 1, 4, 7 and 10 post-B02/B09 on mechanical pain threshold using the von Frey test (up and down method). (**B**) Gene expression of TRAP, CatK and Tcgr1 in the tibio-tarsal joints at day 14 post mAb administration. Fold difference histogram of the transcripts differentially expressed in the tibio-tarsal joints assessed by q-PCR. n=3-6/group. Non parametric Mann-Whitney test. * p ≤ 0.05 from PBS + PBS or B02/B09 + zoledronate groups. (**C**) Effect of chronic T06, a specific cathepsin K inhibitor (iCatK), treatment (40mg/kg, once a day for 14 days, p.o.) during the whole duration of the study (1-14 days) on mechanical pain threshold using the von Frey test (up and down method). n=6-8/group. Data are presented as mean ± SEM. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. ** p<0.01, *** p<0.001 from control group (PBS + vehicle). *** p<0.001 from B02/B09 + PBS or vehicle groups.

Effect of zoledronic acid, a biphosphonate and T06, a specific cathepsin K inhibitor, on B02/B09 induced pain and bone remodelling

Since B02/B09 administration induced bone remodelling/erosion in vivo, we used two different pharmacological strategies (i.e. a bisphosphonate and a cathepsin K inhibitor) to investigate if this bone remodelling/erosion phenomenon is involved in B02/B09-induced pain. While PBS administration did not change paw mechanical threshold, B02/B09 administration induced a significant mechanical allodynia in mice from day 6 to 14 compared to PBS group (Figure 4A). Zoledronic acid (100µg/kg) injected on day 1, 4, 7 and 10 after B02/B09 injection, prevented the development of mechanical allodynia compared to the B02/B09 PBS treated group (Figure 4A). In addition, increased TRAP, Tcirg1, a vacuolar H+-ATPase (V-ATPase) acting as a pump to move protons across the membrane, and to a lesser extent, CatK mRNA expression in the ankle joint induced by B02/B09 administration was significantly reduced by zoledronic acid administration at day 14 (Figure 4B). While PBS + vehicle administration did not change paw mechanical threshold, chronic administration of T06, an inhibitor of cathepsin K, ablated mechanical allodynia development following B02/B09 administration compared to B02/B09 vehicle treated group, which develops significant mechanical allodynia from day 10 to 14 (Figure 4C), confirming the crucial role of bone remodelling/erosion in B02/B09-induced pain.



Figure. 5: (A) Gene expression of ASIC1 and ASIC3 in the tibio-tarsal joint at day 14 post-B02/B09 administration. Fold difference histogram of the transcripts differentially expressed in the tibio-tarsal joint between PBS and B02/B09 mice assessed by q-PCR. n=5-6/group. Non parametric Mann-Whitney test. ** $p \le 0.01$ from the PBS control group. (B) Gene expression of ASIC3, TRPV1 and Substance P in L3-L4-L5 right DRGs at day 14 post-B02/B09 administration. Relative expression histogram of the transcripts differentially expressed in the DRGs between ASIC3+/+ and ASIC3-/mice treated with PBS or B02/B09 assessed by q-PCR. n=4-5/group. Non parametric Mann-Whitney test. (C, D, E, F) Analysis of ASIC3 and TRPV1 expression in sensory neurons of the L3-L4-L5 right DRGs at day 14 in ASIC3+/+ and ASIC3-/- mice treated with PBS or B02/B09 using immunohistochemistry. (C) From left to right, representative photomicrographs of ASIC3 and TRPV1 positive neurons in L3-L4-L5 DRGs of ASIC3^{+/+} + PBS (upper panel) and ASIC3^{+/+} + B02/B09 (lower panel). Merge image (extreme right) shows ASIC3-positive neurons expressing TRPV1 (arrowhead; scale bar, 200µm). (D) Percentage of ASIC3 positive neurons / number of total lumbar DRG neurons in ASIC3^{+/+} + PBS and ASIC3^{+/+} + B02/B09 mice. (E) Percentage of double labelled ASIC3/TRPV1 lumbar DRG neurons / number of total lumbar DRG neurons in ASIC3+/+ + PBS and ASIC3+/+ + B02/B09 mice. (F) Percentage of TRPV1 positive neurons / number of total lumbar DRG neurons in ASIC3+/+ + PBS, ASIC3+/+ + B02/B09, ASIC3-/- + PBS, ASIC3-/- + B02/B09 mice. n=5/group. Data are presented as mean \pm SEM. Non parametric Mann-Whitney test. * p \leq 0.05 compared to ASIC3+/+ + PBS mice.

Effect of B02/B09 on TRPV1, CGRP, substance P, ASIC1 and ASIC3 expression in the joint and

DRGs

ASIC3 ankle joint mRNA expression was significantly increased at day 14 following B02/B09 injection compared to PBS group while ASIC1 mRNA expression was unchanged (Figure 5A). We did not observed any significant changes in the expression of ASIC3, except of course in the ASIC3 KO mice, substance P, CGRP and TRPV1 mRNA expression in the lumbar DRGs at day 14 after B02/B09 administration in all the different groups (Figure 5B). By contrast, using immunohistochemistry, the percentage of ASIC3 positive neurons was significantly increased at day 14 in the WT B02/B09 treated group compared to the WT PBS treated group (71.18 \pm 0.8% vs 63.74 \pm 0.77%, respectively; Figure 5C&D: representative photomicrographs and quantification histogram, respectively). Moreover, the percentage of ASIC3/TRPV1 double positive neurons was also increased in the WT B02/B09 treated group compared to the WT PBS treated group ($17.09 \pm 1.65 \%$ vs $13.03 \pm 1.12\%$, respectively; Figure 5C&E). Finally, the percentage of TRPV1 positive neurons was significantly increased following B02/B09 in both WT and ASIC3 KO mice compared to the WT PBS treated group but not the ASIC3 KO B02/B09 treated group (26.73 ± 1.68 %; 27.82 ± 0.81 %; 21.01 ± 1.12%; 24.86 ± 0.6%, respectively, Figure 5C&F).



Figure. 6 : (**A**, **B**) Effect of local administration of APETx2 (20µM) into the tibio-tarsal joint on day 14 (**A**) and 23 (**B**) post-B02/B09 or PBS injection on mechanical pain threshold using the von Frey test (up and down method). n=6-8/group. (**C**) Effect of B02/B09 or PBS administration in ASIC3^{+/+} and ASIC3^{-/-} mice on mechanical pain threshold using the von Frey test (up and down method). Mechanical paw threshold were assessed at days 7, 14, 20, 24 and 28 following B02/B09 or PBS administration. n=9-19/group. Data are presented as mean ± SEM. Two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 compared to ASIC3^{+/+} + PBS and ASIC3^{-/-} + B02/B09 groups. (**D**, **E**) Effect of B02/B09 or PBS administration in ASIC3^{+/+} and ASIC3^{+/+} and ASIC3^{+/+} and ASIC3^{+/+} the spent in the open arms (**D**) and number of entries in the open arms (**E**) in the elevated plus maze (EPM) test. EPM was performed at day 17 post-B02/B09 administration. The movements of the animals in the EPM test were automatically recorded by a Tukey *post hoc* test. * p ≤ 0.05 compared to the ASIC3^{+/+} + PBS group. [§] p ≤ 0.05 compared to the ASIC3^{+/+} + PBS group. [§] p ≤ 0.05 compared to the ASIC3^{+/+} + PBS group. [§] p ≤ 0.05 compared to the ASIC3^{+/+} + PBS group.

Effect of intra-articular APETx2, a specific ASIC3 blocker, on B02/B09-induced pain

Intra-articular administration of APETx2 (20µmol) or saline did not change paw mechanical threshold in the PBS treated group at day 14 and 23 (**Figure 6 A&B**). B02/B09 induced a significant decrease of paw mechanical threshold at day 14 and 23 (**Figure 6 A&B**). However, intra-articular administration of APETx2 (20µmol) attenuated mechanical allodynia with an effect being detectable 1h post-injection (only at day 14, **Figure 6A**) and lasting up to 24h (only at day 23, **Figure 6B**) compared to the B02/B09 saline treated group in both experiments.

Effect of B02/B09 in WT and ASIC3 KO mice

We also used a genetic strategy using ASIC3 KO mice. While ASIC3 WT animals develop significant mechanical allodynia from day 7 up to 28 following B02/B09 administration compared to ASIC3 WT saline treated group, ASIC3 KO mice did not exhibit any significant mechanical allodynia following B02/B09 administration compared to ASIC3 KO PBS treated group (**Figure 6C**). Of note, we did not observe any weight gain loss or increase clinical score in any of the groups (data not shown). This result reinforces the involvement of peripheral ASIC3 in pain behaviours induced by B02/B09 administration.

We also assessed the development of anxiety using the elevated plus maze test. WT animals injected with B02/B09 spent significantly less time and exhibited less entries in open arms compared to WT PBS treated group, indicating that B02/B09-induced pain is associated with anxiety (**Figure 6D&E**). By contrast, ASIC3 KO mice injected with B02/B09 did not significantly develop anxiety compared to ASIC3 WT and ASIC3 KO PBS treated mice (**Figure 6D&E**).



Figure. 7: **(A)** Representative image of cathepsin K fluorescent imaging in ASIC3^{+/+} and ASIC3^{-/-} PBS or B02/B09 treated mice. **(B, C)** Quantitative histogram of cathepsin K fluorescence in the tibio-tarsal **(B)** and knee **(C)** joints, measured *in vivo* 6 hours after i.v. injection of Cat K 680 FASTTM luminescent probe (2 nmol/100µl) at day 21 post-B02/B09 or PBS injection; n=8-11/group; results are presented as total counts of radiant efficiency/incident excitation power. **(D, E, F, G, H, I)** Effect of B02/B09 or PBS in ASIC3^{+/+} or ASIC3^{-/-} mice at day 28 post-B02/B09 or PBS injection on different bone parameters, quantified using micro-CT imaging: **(E)** trabecular bone mineral density (BMD), **(F)** trabecular bone volume (BV/TV), **(G)** trabecular thickness (Tb.Th) **(H)** trabecular number (Tb.N) and **(I)** trabecular separations (Tb.Sp). n=6-19/group. Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test. * p ≤ 0.05, compared to ASIC3^{+/+} + PBS group.

Effect of B02/B09 on bone remodelling/erosion in ASIC3 KO mice

B02/B09 administration did not significantly increased cathepsin K activity, in ASIC3 WT and KO mice despite a slight increase, compared to ASIC3 WT and KO PBS treated mice at day 21 (**Figure 7A**, representative images, **B**, **C**). This result is in contrast with what we have previously observed in Balb/C mice following B02/B09 administration, and could be due to strain differences.

We observed similar results to the cathepsin K imaging, except for the trabecular separation, in the microCT experiment (**Figure 7D, E, F, G, H**). Thus, most of the microCT parameters remained unchanged following B02/B09 administration in ASIC3 WT and KO mice compared to the PBS treated groups. Only the trabecular separation was significantly increased in ASIC3 WT mice following B02/B09 injection compared to the ASIC3 WT PBS treated group (**Figure 7H**). This parameter was unchanged in ASIC3 KO mice.

Effect of B02/B09 in ASIC3 current

We finally assessed if B02/B09 was able to directly activate and/or potentiate ASIC3 current using patch clamp. While a drop from pH 7.4 to pH 7 induced a strong ASIC3 current as expected, no activation of ASIC3 at resting pH 7.4 was observed following exposure to B02/B09 (1 µg/ml for each; **Figure 8A**, upper panel; **B**, **C**). In contrast, lysophosphatidylcholine (LPC) exposure, previously shown as an ASIC3 activator, potentiated ASIC3 current induced by pH 7 (**Figure 8A**, lower panel, **B**, **C**). Finally, B02/B09 exposure at 1 or 10 µg/ml for each mAbs, did not potentiate pH 7.2 induced ASIC3 current in contrast to LPC (**Figure 8D**, **E**).



Figure. 8: (A) Effects of B02/B09 (1 μ g/ml each) or LPC extracted from bovine brain (10 μ M) on HEK293 cells expressing the mice or rat ASIC3 channels. Following pH 7.0 induced current, B02/B09 or LPC are applied extracellularly in the pH 7.4 bathing solution and another pH 7.0 induced current was finally applied following B02/B09 (upper panel) or LPC (lower panel) exposure. Data are obtained from whole-cell patch-clamp experiments performed at -80 mV. (B) Current induced at resting pH 7.4 (black arrows on A, HP-80 mV). Data from 6 cells transfected with mouse ASIC3 (black symbols) or rat ASIC3 (grey symbols). (C) Ratio of the pH 7.0-induced current (red arrows on A) after/before application of B02/B09 or LPC. Data from 6 cells transfected with mouse ASIC3 (black symbols). (D) Effect of B02/B09 (1 or 10 μ g/ml each, upper panel) or LPC (10 μ M, lower panel) on pH 7.2-induced current. Bottom graph: typical recording illustrating the potentiating effect of LPC on the pH 7.2-induced current recorded in HEK293 cells. (E) Ratio of the pH 7.2-induced current (black arrows on D) after/before application of B02/B09 or LPC. Data from 4-5 cells transfected with mouse ASIC3 (black symbols) or rat ASIC3 (gray symbols).

Discussion

Here, we have demonstrated that patient derived RA associated ACPA induced pain-like behaviour in mice but differ in their pronociceptive and bone erosive properties. While both B09 and D10 mAbs alone already lead to pain, their combination with B02, increased the duration of pain and their pronociceptive potency, especially for the B02/B09 combination which lasted up to 28 days. Interestingly, B02 mAb injected alone was unable to generate pain-like behaviour. B09 and D10 and their combination with B02 did not cause heat but only cold and mechanical hypersensitivity. Importantly, B02/B09 administration was not associated with any signs of inflammation but only bone loss. Blocking osteoclasts activity with a bisphosphonate or a specific cathepsin K inhibitor significantly attenuates B02/B09 induced mechanical hypersensitivity as well as some markers of osteoclast activity. Finally, we provide a functional link between increased osteoclast activity and pain through the sensitization of ASIC3 on joint primary afferent neurons, ultimately leading to pain (**Figure 9**).

Thus, we confirm and extend our previous reports demonstrating that certain subtypes of ACPA are able to induce long lasting pain but with different potency (Krishnamurthy *et al.*, 2016; Wigerblad *et al.*, 2016). For example, D10 and B09 alone induced mechanical hypersensitivity with a different time course. More strikingly, mice injected with B02 did not exhibit any pain while they displayed profound and long lasting pain when associated with D10 and especially B09. One possibility is that these associations, especially B02/B09, lead to an inflammatory reaction. However, B02/B09 administration did not produced any visual signs of inflammation in the joints or increased accumulation of 2-DG in the joint. One may argue that subclinical inflammation could partially explain joint arthralgia in ACPA positive patients (van Steenbergen *et al.*, 2016). However, lipocalin-2 joint content, which has been used to characterize low grade inflammation (Chassaing *et al.*, 2012), was not increased after B02/B09 exposure. Finally, chronic administration of a cyclooxygenase inhibitor, naproxen, failed to reverse B02/B09 induced pain while this was significantly reduced by opiates. Taken together, these results reinforced a lack of an inflammatory component in ACPA-induced pain.



Figure. 9 : Summary of proposed ACPA-induced arthralgia mechanism. **①** ACPA binds citrullinated epitopes on osteoclasts, causing release of CXCL1/IL-8 that can activate and sensitize sensory neurons, through the receptor CXCR2. **②** With the B02/B09 combination: B02 and B09 bind citrullinated epitopes on osteoclasts and fibroblasts, respectively. Activation of osteoclasts and the release of H⁺ or lipids could thereafter activate ASIC3 channels and sensitise sensory neuron in the joint to cause pain.

Therefore, ACPA-induced pain seems rather link to bone erosion due to increase osteoclast activity. We have previously shown that the administration of certain ACPA caused increase osteoclast activity in vitro and bone erosion in vivo (Krishnamurthy et al., 2016; Wigerblad et al., 2016). Interestingly, D10 alone or even associated with B02 did not precipitate bone erosion, which could partially explain the relatively short lasting pain of this combination compared to B02/B09. Only, B02/B09 combination leads to potent bone erosion as demonstrated with microCT, via an increase of bone remodelling and cathepsin K activity. These results suggest that B09 or B02 alone did not lead to bone erosion in vivo but "synergize" together to induce it. Thus, only some subtypes of ACPA, especially when they are associated, are able to generate effective bone erosion and emphasise the importance of epitopes specificity and probably, Fc structure for this effect as previously suggested (Wigerblad et al., 2016; Catrina et al., 2017). These mouse monoclonal antibodies are specific for citrullinated peptides, but among them they have different reactivity patterns for different citrullinated epitopes on different potential target molecules. Since the different monoclonal ACPA varied in their nociceptive potency, it is plausible that certain specific citrullinated epitopes are critical for the induction of pain-like behaviour and also bone erosion (Wigerblad et al., 2016). This may partially explain why subgroups and not all ACPA⁺ individuals develop arthralgia. Therefore, the nociceptive potency of the different ACPA could be link to their reactivity patterns against citrullinated epitopes on different targets especially those engaging osteoclast activity. Preliminary results show that B09 binds to fibroblasts while B02 to CD68⁺ osteoclasts in bone marrow. They also appear to exhibit a different binding profile against citrullinated epitopes. B09 mainly reacts with citpeptides such as those derived from fibrinogen while B02 seems to bind to a new ACPA-target-citpeptides and not cit-epitopes of vimentin and α -enolase as previously thought (Krishnamurthy *et al.*, 2016). So far, citrullinated vimentin (Harre et al., 2012) and possibly α-enolase (Krishnamurthy et al., 2016) have been identified as critical epitopes for ACPA-mediated effects on osteoclasts, but other epitopes may also be important. B02 could help at identifying these new epitopes. Numerous experiment are ongoing to better understand the target(s) of B02 and its effect on osteoclast activity in vitro.

Since ACPA are unable to activate directly sensory neurons *in vitro* (Wigerblad *et al.*, 2016), we previously hypothesized that exposure of osteoclasts (OCs) to ACPA results in the preferential release of IL-8, but not other common pro-inflammatory cytokines, which via an autocrine positive feedback loop activate these same cells and through the activation of its cognate receptor activate nociceptors, leading to pain (Wigerblad *et al.*, 2016). Indeed, intra-articular injection of CXCL1/2, the mouse analogue of IL-8, evokes pain-like behaviour in mice and blockade of the chemokine receptor for CXCL1/2 only partially attenuates ACPA-induced hypersensitivity (Wigerblad *et al.*, 2016). Thus, this mechanism is unlikely to be unique and similar to all ACPA subtypes.

Since increased osteoclast activity occurred following B02/B09 administration and blocking this activation reduced pain, we assessed the involvement of a prototypic proton activated channel largely expressed at the periphery, ASIC3, as bone erosion is associated with the local released of protons. ASIC3 is very sensitive to small drop of pH and has been involved in numerous pain models including models of inflammatory rheumatoid arthritis and osteoarthritis (Deval et al., 2008; Izumi et al., 2012b; Kathleen A Sluka et al., 2013; Hsieh et al., 2017). Following B02/B09 ACPA administration, ASIC3 expression was increased in the joint, at mRNA level and, also in DRGs neurons, mainly in TRPV1 positive cells. This result is in agreement with a relatively large expression of ASIC3 in joint afferents (Ikeuchi et al., 2008; Ikeuchi, Kolker and Sluka, 2009). Moreover, ASIC3 was upregulated in CGRP positive neurons following carrageenan-induced arthritis suggesting its involvement in the development of hyperalgesia (Ikeuchi, Kolker and Sluka, 2009). Here, the administration of APETx2, a specific blocker of ASIC3, reversed established mechanical hypersensitivity at two different time points following B02/B09 administration. In a model of osteoarthritis induced by monoiodoacetate, Izumi et al., (2012) have shown that systemic APETx2 inhibited ASIC3 upregulation in the knee joint afferents, cartilage damage and pain behaviour only at early time point (Izumi et al., 2012). Finally, we observed a lack of mechanical hypersensitivity development in ASIC3 KO mice compared to WT following B02/B09 administration suggesting altogether, a crucial role of ASIC3 in ACPA-induced pain. In models of inflammatory arthritis, ASIC3 has been also involved in pain but with conflicting results on its role in inflammation with some studies suggesting worsen inflammation/disease in

ASIC3 KO mice (Kathleen A Sluka *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). As we did not observed any signs of inflammation in B02/B09 mice, we first investigated a possible direct effect of B02/B09 on ASIC3 activity. Our electrophysiological data argue against such hypothesis since B02/B09 did not directly activate or potentiate ASIC3 current. Some studies have suggested that ASIC3 could be directly involved in bone activity. They are expressed in human (Jahr *et al.*, 2005) and rodent bone (Hanaka *et al.*, 2018). Inhibition of ASIC3 significantly reduced the expression of osteoblast/osteoclast regulators in a tail suspended mice (Hanaka *et al.*, 2018). We are currently testing the direct role of ASIC3 on osteoclast activity *in vitro* following B02/B09 exposure. However, so far, we did not find any difference in several microCT parameters and cathepsin K activity between ASIC3 KO mice and WT following PBS as well as B02/B09 administration. Difference in genetic background (*i.e.* BalbC vs C57Bl6 for ASIC3 KO mice) could explain this discrepancy. C57Bl6 are well known to be resistant to arthritis including lower incidence, reduced severity and higher variation (Caplazi *et al.*, 2015). The resolution of our imaging technics could be also insufficient to investigate bone erosion in this type of mice.

It is well known that increased osteoclast activity is accompanied by robust local changes in the pH acidic environment (Clarke, 2008). Moreover, ASIC3 seems to participate in bone cancer pain through its activation via an increase of acidic extracellular environment (Qiu *et al.*, 2014; Yoneda *et al.*, 2015; Hiasa *et al.*, 2017). While the process of bone destruction by osteoclast is tightly regulated, it is plausible that the release of protons due to increase osteoclast activity following B02/B09 administration activates and sensitizes ASIC3, ultimately leading to pain. Intra-articular acid administration is very potent to produced pain. Only two administrations of an acidic solution at pH 4, 5 days apart, induced long lasting pain up to 28 days, without any significant joint damage or inflammation (Sugimura *et al.*, 2015). Importantly, this effect was blocked by APETx2 indicating an involvement of ASIC3 (Sugimura *et al.*, 2015). Another alternative hypothesis could be the release of some lipids species such as arachidonic acid (AA) and lysophosphatidylcholine (LPC) from OCs, which in turn might directly activate ASIC3 on joint afferent. A recent study by our collaborator clearly demonstrated that AA and LPC are able to directly activate/potentiate ASIC3 (Marra *et al.*, *et al.* 2016). Moreover, intraplantar administration of LPC/AA in rats produced a significant pain behaviour. Notably, these ASIC3 endogenous activators have been identified in the synovial fluid of patients suffering from joint pain, some of those with no apparent signs of inflammation or inflammatory diseases. This is a very attractive hypothesis since some ACPA positive patient suffered from joint pain with no sign of inflammation. We are currently investigated the release of LPC/AA from OCs *in vitro* and LPC/AA content in the bone marrow of control and B02/B09 mice.

To conclude, we confirmed that monoclonal ACPA IgG1 subtypes differ in their pronociceptive and bone erosive properties certainly link to their reactivity patterns against citrullinated epitopes on different targets especially those engaging osteoclast activity. This study also points towards a possible role of ASIC3 sensitization in B02/B09 ACPA-induced pain-like behaviour, providing a functional link between bone erosion and pain through the activation of ASIC3 (**Figure 9**). We suggest that as a result of autoantibody-induced osteoclast activation, certain factors (*e.g.* protons and/or some lipids for instance) are released, which sensitize ASIC3 located on sensory neurons innervating the joint.

Bibliography

Aho, K., Palosuo, T., Raunio, V., Puska, P., Aromaa, A., and Salonen, J.T. (1985). When does rheumatoid disease start? Arthritis Rheum. 28, 485–489.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. *62*, 2569–2581.

Amara, K., Steen, J., Murray, F., Morbach, H., Fernandez-Rodriguez, B.M., Joshua, V., Engström, M., Snir, O., Israelsson, L., Catrina, A.I., et al. (2013). Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. J. Exp. Med. *210*, 445–455.

van Baarsen, L.G.M., de Hair, M.J.H., Ramwadhdoebe, T.H., Zijlstra, I.J.A.J., Maas, M., Gerlag, D.M., and Tak, P.P. (2013). The cellular composition of lymph nodes in the earliest phase of inflammatory arthritis. Ann. Rheum. Dis. *72*, 1420–1424.

Bas, D.B., Su, J., Sandor, K., Agalave, N.M., Lundberg, J., Codeluppi, S., Baharpoor, A., Nandakumar, K.S., Holmdahl, R., and Svensson, C.I. (2012). Collagen antibody-induced arthritis evokes persistent pain with spinal glial involvement and transient prostaglandin dependency. Arthritis Rheum. *64*, 3886–3896.

Caplazi, P., Baca, M., Barck, K., Carano, R. a. D., DeVoss, J., Lee, W.P., Bolon, B., and Diehl, L. (2015). Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. Vet. Pathol. *52*, 819–826.

Catrina, A.I., Svensson, C.I., Malmström, V., Schett, G., and Klareskog, L. (2017). Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. Nat. Rev. Rheumatol. *13*, 79–86.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J. Neurosci. Methods *53*, 55–63.

Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., Gewirtz, A.T., and Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. PloS One 7, e44328.

Clarke, B. (2008) 'Normal bone anatomy and physiology.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology* : *CJASN*. American Society of Nephrology, 3 Suppl 3(Suppl 3), pp. S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206.

Deval, E., and Lingueglia, E. (2015). Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. Neuropharmacology *94*, 49–57.

Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. EMBO J. 27, 3047–3055.

Dixon, W.J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 441–462.

Ettaiche, M., Deval, E., Cougnon, M., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2006). Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 5800–5809.

de Hair, M.J.H., van de Sande, M.G.H., Ramwadhdoebe, T.H., Hansson, M., Landewé, R., van der Leij, C., Maas, M., Serre, G., van Schaardenburg, D., Klareskog, L., et al. (2014). Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis: implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *66*, 513–522.

Hanaka, M., Iba, K., Dohke, T., Kanaya, K., Okazaki, S., and Yamashita, T. (2018). Antagonists to TRPV1, ASICs and P2X have a potential role to prevent the triggering of regional bone metabolic disorder and pain-like behavior in tail-suspended mice. Bone *110*, 284–294.

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., and Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain *32*, 77–88.

Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. J. Clin. Invest. *122*, 1791–1802.

Harre, U., Lang, S.C., Pfeifle, R., Rombouts, Y., Frühbeißer, S., Amara, K., Bang, H., Lux, A., Koeleman, C.A., Baum, W., et al. (2015). Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. Nat. Commun. *6*, 6651.

Hiasa, M., Okui, T., Allette, Y.M., Ripsch, M.S., Sun-Wada, G.-H., Wakabayashi, H., Roodman, G.D., White, F.A., and Yoneda, T. (2017). Bone Pain Induced by Multiple Myeloma Is Reduced by Targeting V-ATPase and ASIC3. Cancer Res. 77, 1283–1295.

Hsieh, W.-S., Kung, C.-C., Huang, S.-L., Lin, S.-C., and Sun, W.-H. (2017). TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. Sci. Rep. *7*, 8870.

Ikeuchi, M., Kolker, S.J., Burnes, L.A., Walder, R.Y., and Sluka, K.A. (2008). Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. Pain *137*, 662–669.

Ikeuchi, M., Kolker, S.J., and Sluka, K.A. (2009). Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. *10*, 336–342.

Izumi, M., Ikeuchi, M., Ji, Q., and Tani, T. (2012). Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. J. Biomed. Sci. *19*, 77.

Jahr, H., van Driel, M., van Osch, G.J.V.M., Weinans, H., and van Leeuwen, J.P.T.M. (2005). Identification of acid-sensing ion channels in bone. Biochem. Biophys. Res. Commun. *337*, 349–354.

Khairnar, A., Marchand, F., Vidal, A., Etienne, M., Miladi, I., Auzeloux, P., Cachin, F., Eschalier, A., Chezal, J.-M., Ardid, D., et al. (2015). 99mTc-NTP 15-5 Imaging for Cartilage Involvement in Experimental Rheumatoid Arthritis: Comparison with Routinely Used Molecular Imaging Methods and Sensitivity to Chronic Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Treatment. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *56*, 798–804.

Kleyer, A., Finzel, S., Rech, J., Manger, B., Krieter, M., Faustini, F., Araujo, E., Hueber, A.J., Harre, U., Engelke, K., et al. (2014). Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. Ann. Rheum. Dis. *73*, 854–860.

Krishnamurthy, A., Joshua, V., Haj Hensvold, A., Jin, T., Sun, M., Vivar, N., Ytterberg, A.J., Engström, M., Fernandes-Cerqueira, C., Amara, K., et al. (2016). Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. Ann. Rheum. Dis. *75*, 721–729.

Kurki, P., Aho, K., Palosuo, T., and Heliövaara, M. (1992). Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. Arthritis Rheum. *35*, 914–917.

Marra, S., Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., Friend, V., Sebille, S., Cognard, C., Ferreira, T., Roux, C., et al. (2016). Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. EMBO J. 35, 414–428.

Molenaar, E.T.H., Voskuyl, A.E., Dinant, H.J., Bezemer, P.D., Boers, M., and Dijkmans, B.A.C. (2004). Progression of radiologic damage in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. Arthritis Rheum. *50*, 36–42.

Nielen, M.M.J., van Schaardenburg, D., Reesink, H.W., van de Stadt, R.J., van der Horst-Bruinsma, I.E., de Koning, M.H.M.T., Habibuw, M.R., Vandenbroucke, J.P., and Dijkmans, B.A.C. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. Arthritis Rheum. *50*, 380–386.

Panwar, P., Xue, L., Søe, K., Srivastava, K., Law, S., Delaisse, J.-M., and Brömme, D. (2017). An Ectosteric Inhibitor of Cathepsin K Inhibits Bone Resorption in Ovariectomized Mice. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *32*, 2415–2430.

del Puente, A., Knowler, W.C., Pettitt, D.J., and Bennett, P.H. (1988). The incidence of rheumatoid arthritis is predicted by rheumatoid factor titer in a longitudinal population study. Arthritis Rheum. *31*, 1239–1244.

Qiu, F., Wei, X., Zhang, S., Yuan, W., and Mi, W. (2014). Increased expression of acid-sensing ion channel 3 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain. Neuroreport *25*, 887–893.

Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B.A.W., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *48*, 2741–2749.

Rice, A.S.C., Cimino-Brown, D., Eisenach, J.C., Kontinen, V.K., Lacroix-Fralish, M.L., Machin, I., Preclinical Pain Consortium, Mogil, J.S., and 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*, 243–247.

Shi, J., van de Stadt, L.A., Levarht, E.W.N., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Trouw, L.A., and van Schaardenburg, D. (2013). Anti-Carbamylated Protein Antibodies Are Present in Arthralgia Patients and Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. *65*, 911–915.

Sluka, K.A., Rasmussen, L.A., Edgar, M.M., O'Donnell, J.M., Walder, R.Y., Kolker, S.J., Boyle, D.L., and Firestein, G.S. (2013). Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. Arthritis Rheum. *65*, 1194–1202.

van Steenbergen, H.W., Mangnus, L., Reijnierse, M., Huizinga, T.W.J., and van der Helm-van Mil, A.H.M. (2016). Clinical factors, anticitrullinated peptide antibodies and MRI-detected subclinical

inflammation in relation to progression from clinically suspect arthralgia to arthritis. Ann. Rheum. Dis. 75, 1824–1830.

Sugimura, N., Ikeuchi, M., Izumi, M., Kawano, T., Aso, K., Kato, T., Ushida, T., Yokoyama, M., and Tani, T. (2015). Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. Eur. J. Pain Lond. Engl. *19*, 629–638.

Taylor, P., Manger, B., Alvaro-Gracia, J., Johnstone, R., Gomez-Reino, J., Eberhardt, E., Wolfe, F., Schwartzman, S., Furfaro, N., and Kavanaugh, A. (2010). Patient Perceptions concerning Pain Management in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. J. Int. Med. Res. *38*, 1213–1224.

WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium (2003). The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. *919*, i–x, 1-218, back cover.

Wigerblad, G., Bas, D.B., Fernades-Cerqueira, C., Krishnamurthy, A., Nandakumar, K.S., Rogoz, K., Kato, J., Sandor, K., Su, J., Jimenez-Andrade, J.M., et al. (2016). Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. Ann. Rheum. Dis. *75*, 730–738.

Yoneda, T., Hiasa, M., Nagata, Y., Okui, T., and White, F. (2015). Contribution of acidic extracellular microenvironment of cancer-colonized bone to bone pain. Biochim. Biophys. Acta *1848*, 2677–2684.

Yu, G.-M., Liu, D., Yuan, N., and Liu, B.-H. (2018). Dual role of acid-sensing ion channels 3 in rheumatoid arthritis: destruction or protection? Immunopharmacol. Immunotoxicol. *40*, 273–277.

van Zanten, A., Arends, S., Roozendaal, C., Limburg, P.C., Maas, F., Trouw, L.A., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Bootsma, H., and Brouwer, E. (2017). Presence of anticitrullinated protein antibodies in a large population-based cohort from the Netherlands. Ann. Rheum. Dis. *76*, 1184–1190.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain *16*, 109–110.

Acknowledgements

This work was supported by The Swedish Research Council, Alice and Knut Wallenberg Foundation and The European Union Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Sklodowska-Curie grant agreement No. 642720.

This work was supported by Inserm, Conseil Régional Auvergne-Rhône-Alpes (project Ressourcement S3, ArthInnov) and Feder as well as the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

PARTIE C Discussion & Perspectives



Article n°I & Article n°2

Partie 1 : Implication des voies de signalisation intracellulaires spécifiquement associées au récepteur TrkA activé par le NGF dans la douleur articulaire, somatique ou viscérale.

Les principaux résultats obtenus dans les deux articles de cette première partie ont permis mettre en évidence qu'une absence d'activation de certaines voies en aval du récepteur de haute affinité au NGF, TrkA, impacte spécifiquement le développement de l'hypersensibilité mécanique, que ce soit dans un contexte de douleur somatique superficielle, profonde articulaire et viscérale, sans affecter l'hyperalgie thermique.

► Le modèle TrkA/C

Pour étudier l'impact d'une absence de NGF ou de son récepteur de haute affinité TrkA à l'âge adulte, les stratégies de *knock-out* total ne sont pas envisageables. En effet, les souris *Ngf*^{-/-} et *TrkA*^{-/-} meurent dans leur premier mois de vie (Crowley *et al.*, 1994; Smeyne *et al.*, 1994). Il serait possible d'utiliser des souris *knock-out* inductible pour TrkA et/ou le NGF, mais au début de ce projet ces souris n'étaient pas disponibles. La stratégie choisie pour ces deux études, avec l'utilisation des souris TrkA/C, a donc été de remplacer uniquement les parties transmembranaire et intracellulaire du récepteur TrkA par celles du récepteur TrkC à la NT3. Ainsi, les souris TrkA/C peuvent lier normalement le NGF mais les voies de signalisation activées en aval du récepteur chimérique TrkA/C seront celles de TrkC au lieu de TrkA. Grâce à cette stratégie, nous avons maintenu l'expression des voies de signalisation communes aux deux récepteurs TrkA et TrkC, mais bloqué les voies de signalisation spécifiquement associées au récepteur TrkA. Néanmoins, plusieurs éléments ne peuvent pas être totalement exclus pour expliquer le phénotype observé chez ces souris.

> La proprioception

Dans un premier temps, nous ne pouvons pas exclure qu'une surexpression des voies de signalisation associées au récepteur TrkC puisse avoir un effet. La liaison de la neurotrophine 3 sur le récepteur TrkC est principalement responsable des mécanismes proprioceptifs (*e.g.* mise en mouvement, équilibre postural) (Coppola *et al.*, 2001). C'est pourquoi, nous avons évalué *in vivo*, l'impact d'une surexpression des voies en aval de TrkC sur le comportement proprioceptif d'animaux TrkA/C *versus* WT. Pour cela, deux tests comportementaux ont été réalisés : (1) le test de la gommette ou *adhesive-removal test* et (2) le test de la traversée de la poutre ou *beam-walk test*. Ces deux tests permettent d'étudier respectivement, la proprioception statique et dynamique (**Figure 48**). Le test de

la gommette n'a pas permis d'identifier de différence entre nos génotypes (**Figure 48 A & B**), par contre, le test de la traversée de la poutre montre une diminution significative du nombre de décrochements (*i.e. foot slips*) chez les souris TrkA/C qu'elles soient hétérozygotes ou *knock-in* chez les mâles, et dans une moindre mesure chez les femelles, par rapport aux souris WT, sans modifier le temps de traversée de la poutre (**Figure 48 C & D**). Les souris TrkA/C présentent donc une légère amélioration de la coordination motrice propre à la proprioception dynamique mais pas à la proprioception statique. Il serait donc intéressant d'approfondir ces phénomènes proprioceptifs chez les souris TrkA/C.



Figure 48 : Evaluation du comportement proprioceptif chez les souris TrkA/C hétérozygotes et knock-in par rapports aux souris WT

 $(\mathbf{A})(\mathbf{B})$ Le test de la gommette a permis d'évaluer la proprioception statique de nos animaux en conditions basales. Le temps de détection (\mathbf{A}) et le temps de retrait (\mathbf{B}) de la gommette ont été enregistrés pour les souris sauvage (WT), hétérozygotes (TrkA/C-Hetero) et *knock-in* (TrkA/C-KI) à la fois chez les mâles et les femelles. $(\mathbf{C})(\mathbf{D})$ Le test de la traversée de la poutre a été utilisé pour évaluer la coordination motrice en conditions basales. Le temps de latence de la traversée de la poutre (\mathbf{C}) et le nombre de décrochements (\mathbf{D}) ont été mesurés chez les souris WT, TrkA/C-Hetero et TrkA/C-KI, à la fois chez les mâles et les femelles. Résultats présentés par la moyenne ± SEM, n=8 par groupe. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 comparé au groupe WT.

Pour préciser quels facteurs impliqués dans la proprioception pourraient être modulés chez les souris TrkA/C, nous avons étudié nos résultats de l'analyse par séquençage des ARNm des DRGs L4-L5-L6 en conditions basales et dans le modèle d'arthrite. Ces résultats ont été obtenus dans le dernier mois de ma thèse, c'est pourquoi de nombreux éléments n'ont pas été abordés précédemment.

Cette analyse transcriptomique montre que certains facteurs comme Runt-related transcription factor 3 (Runx3), qui est exprimé spécifiquement par les neurones sensoriels TrkC⁺ (Levanon *et al.*, 2002), voit son expression significativement augmentée (log2 fold change = 0,7755) dans les DRGs des souris knock-in TrkA/C contrôles en comparaison à des souris WT. Il en est de même pour le marqueur des fibres proprioceptives : la parvalbumine (Pvalb) (log2 fold change = 0,8105), même si, cette augmentation n'a pas été retrouvée dans les DRGs lombaires par hybridation in situ (Gorokhova et al., 2014). Notons que ces surexpressions ne sont pas modulées suite à l'induction de la monoarthrite. L'expression de Stac1 coïncide majoritairement avec les neurones TrkA+ de type nociceptif peptidergique et est totalement exclue des neurones TrkB⁺ et TrkC⁺ alors que Stac2, lui, est spécifique des neurones nociceptifs non-peptidergiques, des neurones mécano-sensibles TrkB⁺ et d'une souspopulation de propriocepteurs TrkC⁺ (Legha *et al.*, 2010). Dans notre étude, l'expression de Stac1 (*Stac*) est diminuée en conditions basales (log2fold change = -0,2370 - TrkA/C saline vs WT saline) et cette sous-expression est un peu plus marquée dans le modèle d'arthrite (log2fold change = -0,3699 -TrkA/C MoAr vs WT MoAr). Concernant Stac2, il est uniquement surexprimé suite à la monoarthrite (log2fold change = 0,2834 - TrkA/C MoAr vs WT MoAr). Les souris TrkA/C pourraient donc présenter une diminution du nombre de neurones peptidergiques nociceptifs TrkA⁺ associée à une augmentation des neurones proprioceptifs TrkC⁺ ou certaines fibres TrkA⁺ pourraient switcher vers un profil proprioceptif ou en partie proprioceptif. Gorokhova et al., n'ont pas montré de différence de ségrégation des fibres nociceptives en fibres peptidergiques et non peptidergiques, ni, semble-t-il de switch phénotypique des neurones (Gorokhova et al., 2014). Il serait intéressant de vérifier ces résultats par immunohistochimie. Notons ici, que le nombre total de neurones au niveau des DRGs lombaires (i.e. L3-L4) et thoraciques (i.e. T11-T12) est réduit respectivement, de 16% et 18% chez les souris TrkA/C-KI (Gorokhova et al., 2014). Ceci pourrait expliquer en partie la diminution initiale d'un certain nombre de facteurs.

Nous pensons peu probable que les résultats obtenus concernant la diminution de l'hypersensibilité mécanique chez les souris TrkA/C soient dus uniquement à une surexpression des voies de signalisation TrkC. NT3/TrkC n'est que peu impliquée dans la nociception, particulièrement en condition inflammatoire. Une revue récente fait ressortir des résultats peu convaincants avec à la fois des mécanismes pro- et anti-nociceptifs de la NT3 (Khan and Smith, 2015). Concernant un rôle pro-nociceptif de la NT3, par exemple, l'injection intrathécale de NT3 (200 ng/jour) pendant 20 jours induit une allodynie mécanique 10-20 jours après la première injection laissant supposer un mécanisme central (White, 1998). L'administration de NT3 (50 μ g) délivrée sur 7 jours par une micropompe au niveau des DRGs L5 entraine une hypersensibilité mécanique le 1^{er} jour mais pas au 3^{ème} ou au 7^{ème} jour (Zhou *et al.*, 2000). Par contre, la NT3 (600 ng/ μ L/h) pendant 7 jours prévient et atténue l'hyperalgie thermique mais pas l'hyperalgie mécanique dans un modèle de douleur

neuropathique par ligation du nerf sciatique. Cet effet passerait par la suppression de l'activation de la p38 MAPK et de l'expression de TRPV1 suite à la neuropathie (Wilson-Gerwing *et al.*, 2005).

Par contre, nous ne pouvons pas exclure totalement que la surexpression des voies de signalisation TrkC permette le développement et le maintien de l'hyperalgie thermique au chaud. Il semble, au moins, que des voies communes à TrkA et TrkC soient impliquées dans ce phénomène.

► Les voies c-Jun et p38 MAPK

Avant de réaliser l'analyse transcriptomique par séquençage, nous avions observé une modulation spécifique des voies de signalisation de c-Jun et de p38 MAPK parmi les voies de signalisation étudiées initialement, dans le modèle de douleur somatique par incision intra-plantaire. Les souris TrkA/C présentaient une absence d'augmentation de l'expression des ARNm *c-Jun* et *p38* MAPK au niveau des DRGs L4-L5-L6 ipsilatéraux comparés aux souris WT suite à l'incision intraplantaire, par PCR quantitative (résultats présentés dans l'Article n°1). De manière intéressante, nous avons retrouvé dans l'analyse transcriptomique, une diminution spécifique de l'expression de *c-Jun* au niveau des DRGs L4-L5-L6 chez les souris TrkA/C knock-in monoarthritiques en comparaison aux souris WT monoarthritiques sans altération de son expression en conditions basales (résultats présentés dans l'Article n°2). C-Jun pourrait donc jouer un rôle spécifique dans l'hypersensibilité mécanique. En effet, la voie de signalisation JNK capable d'activer c-Jun au niveau de la moelle épinière semble jouer ce rôle spécifique en condition inflammatoire (Gao and Ji, 2010; Gao et al., 2010; Chen et al., 2014; Wang et al., 2017). De manière intéressante, la voie JNK/c-Jun semble être directement associée à l'augmentation de l'expression du canal ASIC3 en contexte inflammatoire appuyant nos hypothèses (Mamet, Lazdunski and Voilley, 2003). La protéine c-Jun est activée en aval de la kinase N-terminale c-Jun (JNK) et forme, en combinaison avec c-Fos, le complexe protéique activateur 1 (AP-1). L'expression de *c-Fos* est aussi significativement diminuée (log2 fold change = -0.8375) chez les souris TrkA/C knock-in monoarthritiques en comparaison aux souris WT monoarthritiques. Ainsi, la formation du complexe AP-1 semble être limitée chez les souris TrkA/C en condition inflammatoire. Comme TrkA est aussi exprimé au niveau des ostéoclastes, il pourrait y avoir une diminution similaire de l'activation des voies c-Jun et potentiellement du complexe AP-1 dans ces cellules. Ce complexe est impliqué dans la différenciation ostéoclastique induite par le ligand de RANK (RANKL) (Ikeda et al., 2004) et stimule le promoteur du gène de la cathepsin K dans des cultures in vitro de macrophages RAW 264.7 (i.e. lignée cellulaire classiquement utilisée pour la différenciation des macrophages en ostéoclastes à partir d'une lignée immortalisée) (Pang et al., 2007). Ainsi, la diminution de l'activité de la cathepsine K, mise en évidence par imagerie à fluorescence dans le modèle d'arthrite, traduisant une diminution de la résorption osseuse associée à une réduction de l'expression de la TRAP, et donc de l'activation ostéoclastique au niveau articulaire, pourrait être directement associée à la diminution de

l'activation des voies de signalisation c-Jun et c-Fos et de la formation du complexe AP-1. Il serait intéressant de restaurer l'expression de c-Jun par thérapie génique chez les souris TrkA/C pour confirmer une implication directe de c-Jun dans la douleur mécanique et/ou dans l'activation ostéoclastique. Nous pourrions aussi directement étudier l'effet d'une inhibition spécifique de la voie c-Jun chez les souris WT dans un modèle CFA sur le comportement nociceptif et le remodelage osseux et préciser cette dernière fonction en réalisant des cultures d'ostéoclastes.

L'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre TrkA (MNAC13 ou IPTRK3) chez la souris dans différents modèles de douleur (e.g. formaline, inflammatoire...) semble perturber spécifiquement la voie de signalisation intracellulaire PLCy (Ugolini et al., 2007), qui conduit à l'activation de JNK en amont de c-Jun mais aussi de p38 MAPK (Patapoutian and Reichardt, 2001). Si l'on s'intéresse à la voie p38 MAPK, son activation dans les neurones des DRGs est connue pour participer au développement de la douleur, notamment mécanique dans un contexte de douleur post-opératoire (Mizukoshi et al., 2013). En condition d'inflammation périphérique, l'activation de p38 MAPK semble aussi nécessaire à l'augmentation de l'expression du canal ionique TRPV1 (Ji et al., 2002). Suite aux résultats de l'Article n°1, nous avons émis l'hypothèse qu'il existerait un lien entre les voies de signalisation NGF/TrkA/p38 MAPK et le développement de l'hypersensibilité mécanique dans le modèle de douleur post-opératoire. Aucune différence d'expression transcriptionnelle de p38 MAPK au niveau des DRGs lombaires n'a été observée dans le modèle cystite (Article n°1) par PCR quantitative ou dans le modèle de douleur inflammatoire articulaire (Article n°2) par séquençage des ARNm. Il serait intéressant d'étudier au niveau protéique, l'activation de p38 MAPK (analyse de la phopho-p38 et p38 par western-blot) dans ces deux derniers modèles pour nous permettre de confirmer ou non son implication.

► Rôle du récepteur p75^{NTR}

L'absence d'activation des voies de signalisation spécifiquement associées au récepteur TrkA chez les souris TrkA/C, nous a amené à suggérer un lien direct de cause à effet entre les voies TrkA et les résultats obtenus chez ces animaux. Ainsi, dans les Articles n°1 et n°2, nous avons conclu que les voies de signalisation spécifiquement associées à TrkA étaient nécessaires au développement de l'hypersensibilité mécanique dans nos différents modèles. Cette conclusion est, elle aussi, discutable. En effet, nous ne pouvons pas exclure un rôle du récepteur de faible affinité au NGF, le récepteur p75^{NTR}. Malgré un nombre d'études plus important démontrant un rôle essentiel de TrkA dans la mise en place de l'hyperalgie mécanique (Bergmann *et al.*, 1998; Malik-Hall, Dina and Levine, 2005; Di Castro *et al.*, 2006; Nencini *et al.*, 2017; Tomlinson *et al.*, 2017), certains auteurs ont suggéré une fonction essentielle du récepteur p75^{NTR} dans la mise en place de cette hyperalgie mécanique (Khodorova, Nicol and Strichartz, 2013). En outre, nous avons pu observer une augmentation de l'expression de la voie de signalisation

impliquant c-Jun qui peut être activée à la fois par TrkA et par p75^{NTR} mais pas par le complexe TrkA/p75^{NTR} (Nykjaer, Willnow and Petersen, 2005; Toni, Dua and van der Graaf, 2014). Notons que lorsque les récepteurs TrkA et p75NTR sont co-exprimés, p75NTR augmente par 100 l'affinité du NGF pour TrkA (Reichardt, 2006; Vilar, 2017). La coopération (indirecte) de TrkA et p75NTR est possible dans l'induction des mécanismes nociceptifs et ne peut donc pas être exclue dans notre étude (Sung et al., 2018). Les souris TrkA/C présentent une diminution de l'expression de p75NTR au niveau des DRGs lombaires en conditions basales (log2 fold change = -0,5888) plus prononcée suite à l'induction de la MoAr (log2 fold change = -0,7488). La question se pose donc de savoir si les résultats observés dans nos études ne résulteraient pas de la diminution de l'expression du récepteur p75^{NTR} lui-même ou au moins d'une diminution de la coopération des récepteurs TrkA et p75NTR chez les souris TrkA/C? Il serait aussi intéressant d'étudier l'expression de p75NTR ainsi que TrkA au niveau articulaire. En effet, en condition physiologique, les récepteurs TrkA et p75NTR sont exprimés au niveau de l'os alors que seul le récepteur p75NTR est exprimé au niveau du cartilage articulaire (Chartier et al., 2017). Ainsi, cette distinction en termes d'expression pourrait expliquer la dichotomie d'effet observée entre le remodelage osseux et le remodelage du cartilage chez les souris TrkA/C. Ces conclusions ne restent toutefois que des hypothèses et nécessitent des investigations complémentaires, en réalisant à la fois des analyses par western-blot et par immunohistochimie au niveau de l'articulation tibio-tarsienne. Notons, que l'étape de décalcification souvent utilisée pour l'IHC, affecte significativement l'antigénicité des peptides et protéines et entraine une réduction importante de l'immunoréactivité pour le NGF et le récepteur p75^{NTR} à l'âge adulte (Chartier et al., 2017). Nous pourrions évaluer l'expression au niveau articulaire de p75^{NTR} et de TrkA sans étape de décalcification par un système de plastification des tissus.

► Hyperalgie thermique

L'hyperalgie thermique au chaud induite par le NGF est largement dépendante du canal TRPV1 (Shu and Mendell, 1999; Caterina *et al.*, 2000; Huang, Zhang and McNaughton, 2006). Dans notre étude, les souris TrkA/C *knock-in* présentent une diminution significative des ARNm *Trpv1* et d'un régulateur du complexe TRPV1-TRPA1 : la protéine transmembranaire 100 (*Tmem100*), comparées à des souris WT. Compte tenu de la réduction de l'expression de ces thermo-transducteurs, nous aurions pu nous attendre à une diminution de l'hyperalgie thermique au chaud chez les souris TrkA/C-KI. Or, que ce soit avec le test de l'immersion de la patte à 46°C (Article n°2) ou avec le test du Hargreaves (Article n°1 & Gorokhova *et al.*, 2014) aucune différence n'a été montrée entre les animaux WT et TrkA/C dans nos différents modèles. Enfin, la réponse globale à la capsaïcine reste identique entre nos génotypes et suggère que, malgré la diminution de l'expression de l'ARNm *Trpv1*, l'expression protéique n'est peut-être pas affectée (Gorokhova *et al.*, 2014). Ceci n'exclut pas l'existence de mécanismes compensatoires dans le maintien de l'hypersensibilité thermique chez les souris

TrkA/C par d'autres thermo-transducteurs que TRPV1. Parmi eux, le canal anoctamine 1 et le canal Nav1.9 voient leur expression augmenter. En outre, il a été montré précédemment que certaines voies de signalisation intracellulaires activées par le récepteur TrkA et le récepteur TrkC sont communes à ces deux récepteurs au moins durant le développement (Gorokhova *et al.*, 2014). Afin de vérifier la réponse neuronale des fibres nerveuses au chaud et à la capsaïcine, il serait intéressant de réaliser une expérience d'imagerie calcique sur des cultures primaires de neurones de DRGs de souris WT et TrkA/C et de vérifier la potentialisation de ces réponses par le NGF.

L'expression du canal sensible au menthol TRPM8, un thermorécepteur au froid (nocif ou non), est diminuée au niveau des DRGs (lombaires et thoraciques) chez les souris TrkA/C et est associée à une tolérance plus élevée des souris TrkA/C aux températures autour de 14°C (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Gorokhova *et al.*, 2014; Article n°2). Le NGF *via* les voies de signalisation associées à TrkA (*i.e.* PI3K, p38 MAPK et JNK), augmente l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de TRPM8 ainsi que son expression à la membrane (Kayama *et al.*, 2017). Ainsi, les voies p38 MAPK et c-Jun (*via* JNK) en aval de TrkA pourraient participer au développement de l'hyperalgie au froid. TRPA1, qui lui possède un rôle plus controversé dans la perception nociceptive au froid (Caspani and Heppenstall, 2009) ne voit pas son expression modulée chez les souris TrkA/C. L'une des perspectives possibles serait de s'intéresser à cette problématique.

> Remarque concernant le modèle viscéral de cystite

Nous n'avons pas retrouvé de variations représentatives par PCR quantitatives de certaines voies de signalisation dans le modèle viscéral de cystite. Cette analyse a été réalisée sur les DRGs L6 et S1 dans leur intégralité, or, ils ne contiennent que 5% (pour S1) à 20-30% (pour L6) de fibres afférentes innervant spécifiquement la vessie (Yoshimura *et al.*, 2003 & Article n°1), pouvant ainsi masquer les variations d'expression au niveau des neurones innervant spécifiquement la vessie. Nous pourrions vérifier ces résultats sur des neurones de DRG L6 et S1 rétromarqués puis microdisséqués par PCR quantitatives.

► Le modèle de MoAr

Le modèle de douleur inflammatoire articulaire utilisé dans l'Article n°2 est le modèle de monoarthrite induite par le CFA. Ce modèle reste le modèle de PR le plus utilisé dans le domaine de la douleur, mais il manque de pertinence clinique quant au caractère systémique de la pathologie. C'est pourquoi, nous avons essayé un modèle plus pertinent cliniquement chez les souris TrkA/C : le modèle de polyarthrite induit par l'injection d'un cocktail d'anticorps anti-collagène de type II (modèle CAIA).

Le modèle CAIA avait déjà été utilisé au sein du laboratoire chez des souris Balb/c. Ce modèle entraine le développement d'une inflammation articulaire mesurée par un score d'arthrite macroscopique (schéma ci-contre, score de 0 et 60) et nécessite une synchronisation par l'injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS – E.coli) au 3^{ème} jour. Cette inflammation débute 7 à 10 jours après l'injection du cocktail, perdure jusqu'au 35^{ème} jour et est associée à une hypersensibilité mécanique mesurée par le test de von Frey (**Figure 49 A & B**).





Figure 49 : Evaluation de l'inflammation articulaire et de l'allodynie mécanique dans le modèle CAIA induit dans différentes souches de souris

Mesure du score d'arthrite (**A**, **C** & **E**) et de l'allodynie mécanique par le test de von Frey au niveau des pattes postérieures (**B**, **D** & **F**) chez des souris Balb/c (**A** & **B**), C57Bl/6 du fournisseur Janvier (**C** & **D**) et C57Bl/6 TrkA/C KI et TrkA/C WT littermates (**E** & **F**) suite à l'injection d'un cocktail d'anticorps. Résultats présentés par la moyenne \pm SEM, n=8 per group. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 comparé à la baseline.

LPS : lipopolysaccharide

Compte tenu de la souche C57Bl/6 utilisée pour réaliser la construction génétique des souris TrkA/C, le modèle CAIA a été testé chez des souris C57Bl/6 de chez Janvier avec l'injection d'un cocktail de 8 anticorps (Modiquest) à la dose de 3 mg/souris suivi d'une injection de LPS 3 jours après. Les souris Janvier ont développé une inflammation articulaire mesurée par le score d'arthrite (**Figure 49 C**) ainsi qu'une allodynie mécanique relativement modérée (**Figure 49 D**). Quant aux souris C57Bl/6 TrkA/C WT, élevées dans notre animalerie, elles ont développé une inflammation articulaire bien plus faible (**Figure 49 E**) mais pourtant elles ont présenté une allodynie mécanique (**Figure 49 F**). De manière intéressante, les souris TrkA/C *knock-in*, quant à elles, n'ont développé ni inflammation ni allodynie mécanique suggérant une résistance de ces souris dans nos conditions d'élevage au développement d'une PR d'origine auto-immune par l'injection d'un cocktail d'anticorps (**Figure 49 E & F**).

Cette résistance à l'induction de pathologies auto-immunes chez cette souche a déjà été rapportée (Baddack *et al.*, 2013). Il est possible que la dose de cocktail injectée pour induire la PR soit insuffisante ou que la nature du cocktail en elle-même soit inadaptée pour cette souche. En outre, l'absence d'inflammation chez les souris TrkA/C suggère un rôle direct des voies TrkA activées par le NGF dans l'inflammation, rôle qui reste encore à ce jour relativement controversé avec des effets anti- et pro-inflammatoires rapportés. Il est possible que différents mécanismes inflammatoires soient mis en jeu lors du développement d'une inflammation locale (modèle CFA) ou systémique (modèle CAIA) (Prencipe *et al.*, 2014; Minnone, De Benedetti and Bracci-Laudiero, 2017).

NGF et métabolisme osseux

L'un des résultats clés de l'Article n°2 est la diminution de l'activité ostéoclastique suite à l'absence d'activation des voies de signalisation TrkA. A ce jour, le lien entre NGF, TrkA et métabolisme osseux n'est que peu connu. Le NGF participe à l'innervation sensitive de l'os au cours du développement, participant ainsi au processus d'ossification primaire et secondaire (Tomlinson *et al.*, 2016). Une étude récente a aussi mis en évidence qu'un traitement avec un anti-NGF (muMab 911) dans un modèle d'arthrose (MIA) chez le rat induit une diminution de la douleur mécanique (l'hyperalgie thermique n'ayant pas été testée) associée à une réduction du nombre d'ostéoclastes sans affecter les dommages au niveau du cartilage ou l'inflammation synovial (Xu *et al.*, 2016). Nos résultats permettraient d'étendre ces résultats à un modèle d'arthrite induite par le CFA et l'effet du NGF sur les ostéoclastes semblerait dépendre de l'activation de TrkA. L'une des perspectives serait d'évaluer directement l'impact du NGF et/ou TrkA et de leur inhibition sur l'activité des ostéoclastes. Il serait donc intéressant de réaliser des cultures *in vitro* d'ostéoclastes à partir de moelle osseuse de souris sauvages et de souris TrkA/C et d'évaluer l'impact d'une inhibition ou d'un apport de NGF sur ces cultures. Enfin, le métabolisme osseux correspond à un équilibre entre activité ostéoclastique et
ostéoblastique. Nous pourrions donc réaliser des co-cultures afin d'évaluer l'effet du NGF (ou de certaines voies en aval du NGF comme c-Jun) grâce à des inhibiteurs spécifiques de ces voies, sur l'expression et la libération de médiateurs (*e.g.* RANKL) par les ostéoblastes capables de stimuler l'activité ostéoclastique.

L'observation d'arthropathies destructrices suite à l'utilisation d'anti-NGF en association avec des AINS avait questionnée la communauté scientifique quant à l'utilisation de ce type de traitement au moins dans l'arthrose. Notre étude suggère un rôle protecteur de l'inhibition de certaines voies en aval de TrkA au niveau osseux. Ces résultats sont confortés par un rapport final récent d'études cliniques de phase III pour deux anti-NGF, le Tanezumab et le Fasinumab qui, sur une cohorte de 1200 patients arthrosiques, n'ont observé aucun cas d'ostéonécrose (Mullard, 2015).

Article n°3

Partie 2 : Rôle des canaux ASIC3 dans l'arthralgie induite par les ACPA.

Les résultats obtenus dans la deuxième partie de cette thèse et présentés dans l'Article n°3 montrent un rôle majeur de l'interrelation système immunitaire et système nerveux dans la douleur associée à la PR. Ainsi, il existe un potentiel pro-nociceptif variable selon les sous-types d'autoanticorps IgG1 ACPA considérés et la combinaison des sous-types entre eux. Ce potentiel peut varier en termes d'intensité et de durée et pourrait dépendre de la réactivité des différents sous-types d'ACPA vis-à-vis d'épitopes citrullinés spécifiques. Par exemple, nous avons pu voir que les sous-types B09 ou D10 d'ACPA étaient capables d'induire un comportement douloureux chez la souris avec une temporalité différente. De manière intéressante, le sous-type B02, qui à lui-seul n'induit pas de comportement douloureux, a pu, une fois administré en combinaison avec B09, et dans une moindre mesure D10, potentialiser leur effet pro-nociceptif. La question se pose donc de savoir quels sont les épitopes citrullinés ciblés par ces différents sous-types d'ACPA et seraient-ils liés à leur potentiel nociceptif ?

Lorsque l'on regarde les profils de fixation des ACPA B02 et B09 (*spider graph* ci-contre) sur les différentes protéines classiquement connues pour présenter des résidus citrullinés (cit-) : le fibrinogène, la vimentine, l' α -enolase (CEP-1), les histones 2a/b, H4 et les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes



(hnRNP) B1 et A3, on constate, deux types de profils complètement différents. Le sous-type B09 s'associe à différents épitopes citrullinés : fibrinogènes, hnRNP et différentes histones présents au niveau des fibroblastes (principalement) et possède donc une remarquable réactivité croisée. Alors que B02 ne se lie à aucun épitopes dits « classiques ». Cette dissemblance est aussi retrouvée en termes de capacité à induire un comportement douloureux. De plus, nous avons pu mettre en évidence une synergie de cette combinaison d'ACPA, qui amplifie le comportement nociceptif certainement dû à l'érosion osseuse en l'absence d'inflammation. Etonnamment, à l'heure actuelle, les épitopes citrullinés démontrés comme étant associés à l'activité ostéoclastique sont la cit- α -enolase (Krishnamurthy *et al.*, 2016) et la cit-vimentine (Harre *et al.*, 2012), or B02 ne se lie à aucun de ces épitopes. Ce dernier pourra potentiellement permettre d'identifier de nouvelles cibles citrullinées impliquées dans l'augmentation de l'activité ostéoclastique par les ACPA, voir de définir un nouveau facteur de risque d'une PR plus agressive.

Le fragment Fc des IgG ACPA détermine leur fonction effectrice et présente des variations dans leurs profils de galactosylation, de sialylation et de fucosylation chez les patients PR ou dans des modèles animaux d'arthrite (Scherer *et al.*, 2010; Rombouts *et al.*, 2015a; Pfeifle *et al.*, 2017). Ainsi les changements phénotypiques des fragments Fc pourraient être directement associés à l'acquisition d'un profil pro-nociceptif en leur donnant la capacité ou non de fixer certains épitopes citrullinés particuliers (Molendijk, Hazes and Lubberts, 2018). Pour autant, aucun profil d'ACPA n'a pu être associé à l'activité et à la progression de la pathologie chez des patients avec une PR précoce (van Beers *et al.*, 2013; Kurowska *et al.*, 2017). En outre, ces profils évoluent dans le temps chez un même individu (Rombouts *et al.*, 2015b). Il est donc difficile, à l'heure d'aujourd'hui, de caractériser les profils évolutifs des ACPA en fonction des stades de la PR et encore moins de définir un profil pro-nociceptif.

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence un lien direct entre la douleur induite par la combinaison B02/B09 d'ACPA, l'activité ostéoclastique et la sensibilisation des canaux ASIC3. L'étude électrophysiologique de patch clamp n'a, par contre, pas montré d'activation directe de ces canaux par les ACPA. Comme les canaux ASIC3 peuvent être activés par des variations de pH même très faibles, la première hypothèse suppose que les protons libérés suite à la résorption osseuse induite par les ACPA, pourraient sensibiliser les canaux ASIC3 présents au niveau des fibres nociceptives. En effet, lorsque les ostéoclastes sont activés, ils vont entrainer un résorption osseuse locale libérant un influx de protons à partir de l'os, conduisant à une diminution très locale du pH (Krieger, Frick and Bushinsky, 2004). Il est difficile de déterminer (1) jusqu'où la diminution de pH est effective en dehors du site de dégradation, (2) s'il existe un gradient permettant de faire varier le pH de 4,5 au site de dégradation osseuse jusqu'à des pH proches de 7,2 (limite supérieure du pH d'activation des ASIC3), (3) si les fibres nociceptives mises en jeu sont uniquement celles proches des lacunes de résorption et (4) si la migration des ostéoclastes permet de libérer dans un plus vaste territoire les ions H⁺ présents au niveau des lacunes de résorption. Pour tenter de répondre à ces questions, il faudrait pouvoir déterminer le pH *in vivo* au niveau de la moelle osseuse, l'os environnant et dans le synovium, ce qui reste très compliqué expérimentalement.

Outre les protons, les canaux ASIC3 peuvent être activés par des lipides tels que l'acide arachidonique (AA) ou le lysophosphatidyl-choline (LPC) à pH physiologique (Marra *et al.*, 2016). De manière intéressante, ces deux lipides sont retrouvés dans les exsudats articulaires humains provenant de patients atteints de pathologies rhumatismales comme la PR. La deuxième hypothèse, non exclusive, que nous proposons, serait que les ostéoclastes, une fois activés, libéreraient ces différents lipides capables de sensibiliser et/ou activer les canaux ASIC3 présents sur les fibres afférentes primaires nociceptives au sein de l'environnement articulaire. De manière intéressante, la libération de lipides par les ostéoclastes activés a déjà été montrée lors de métastases osseuses (Krzeszinski *et al.*, 2017). Dès le stade préclinique, les patients PR-ACPA⁺ peuvent présenter des

altérations dans l'architecture osseuse corticale, traduisant une activation ostéoclastique (Kleyer *et al.*, 2014). Ainsi, cette activation précoce des ostéoclastes pourraient être associée à la libération de lipides et à l'activation des canaux ASIC3. Des études lipidomiques sont nécessaires pour caractériser la présence de lipides au niveau articulaire en présence d'ACPA et notamment la combinaison B02/B09. Ces futures investigations permettront d'affiner les mécanismes mis en jeu dans le développement de l'arthralgie induite par les ACPA.

Même si nos différentes études se sont intéressées à des contextes de douleurs distincts, il en ressort un dénominateur commun : les canaux ASIC3. Ces canaux sont activables par différents types de stimuli : les protons et/ou des lipides, et voient leur expression modulée par le NGF et notamment *via* les voies c-Jun et p38 MAPK. Ainsi, que ce soit dans un contexte de douleur articulaire associée à une inflammation ou non (arthralgie) dans la PR ou dans un contexte de douleur post-opératoire ou viscérale de type cystite, l'inhibition de ces canaux semble présenter un intérêt thérapeutique majeur dans le traitement de ces symptômes douloureux de différentes étiologies.

PARTIE D Références Bibliographiques



Abdelhamid, R. E. and Sluka, K. A. (2015) 'ASICs Mediate Pain and Inflammation in Musculoskeletal Diseases.', *Physiology (Bethesda, Md.)*, 30(6), pp. 449–59. doi: 10.1152/physiol.00030.2015.

Abrahamsen, B. et al. (2008) 'The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain.', Science (New York, N.Y.), 321(5889), pp. 702–5. doi: 10.1126/science.1156916.

Aby, F. et al. (2018) 'Inflammatory-induced spinal dorsal horn neurons hyperexcitability is mediated by P2X4 receptors.', Pain reports. Wolters Kluwer Health, 3(3), p. e660. doi: 10.1097/PR9.0000000000660.

Aggarwal, D. and Abraham, S. (2016) 'Rheumatoid Arthritis Treatments : A Historical Perspective', I, pp. 1–9.

Ahmed, S., Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1995) 'BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(8), pp. 5765–78. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643217 (Accessed: 19 July 2018).

Aho, K. et al. (1985) 'When does rheumatoid disease start?', Arthritis and rheumatism, 28(5), pp. 485–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4004958 (Accessed: 19 April 2018).

Ai, R. et al. (2015) 'DNA Methylome Signature in Synoviocytes From Patients With Early Rheumatoid Arthritis Compared to Synoviocytes From Patients With Longstanding Rheumatoid Arthritis', Arthritis & Rheumatology, 67(7), pp. 1978–1980. doi: 10.1002/art.39123.

Ai, R. et al. (2016) 'Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes.', *Nature communications*, 7, p. 11849. doi: 10.1038/ncomms11849.

Al-Qudah, M. A. and Al-Dwairi, A. (2016) 'Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion.', *Neurosciences* (*Riyadh*, *Saudi* Arabia), 21(4), pp. 306–313. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744458 (Accessed: 28 May 2018).

Aletaha, D. et al. (2010) '2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative', Arthritis & Rheumatism. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 62(9), pp. 2569–2581. doi: 10.1002/art.27584.

Alloui, A. et al. (2006) 'TREK-I, a K b channel involved in polymodal pain perception', The EMBO Journal, 25, pp. 2368–2376. doi: 10.1038/.

Aloe, L. et al. (1992) 'Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis', Arthritis & Rheumatism. John Wiley & Sons, Inc., 35(3), pp. 351–355. doi: 10.1002/art.1780350315.

Aloe, L. et al. (2012) 'Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use', Journal of Translational Medicine, 10(1), p. 239. doi: 10.1186/1479-5876-10-239.

Aloe, L., Tuveri, M. A. and Levi-Montalcini, R. (1992) 'Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation.', *Rheumatology international*, 12(5), pp. 213–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1290024 (Accessed: 23 July 2018).

Alpízar-Rodríguez, D. et al. (2016) 'The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis', *Rheumatology*, p. kew318. doi: 10.1093/rheumatology/kew318.

Altawil, R. et al. (2016) 'Remaining Pain in Early Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Methotrexate', Arthritis Care & Research, 68(8), pp. 1061–1068. doi: 10.1002/acr.22790.

Amara, K., Steen, J., Murray, F., Morbach, H., Fernandez-Rodriguez, B. M., Joshua, V., ... Malmström, V. (2013). Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(3), 445–55. https://doi.org/10.1084/jem.20121486

Andersen, H. et al. (2008) 'Spatial and temporal aspects of muscle hyperalgesia induced by nerve growth factor in humans', *Experimental Brain Research*, 191(3), pp. 371–382. doi: 10.1007/s00221-008-1531-5.

Andreev NYu et al. (1995) 'Peripheral administration of nerve growth factor in the adult rat produces a thermal hyperalgesia that requires the presence of sympathetic post-ganglionic neurones.', *Pain*, 63(1), pp. 109–15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577480 (Accessed: 7 August 2018).

Andresen, T. et al. (2016) 'Intradermal Injection with Nerve Growth Factor: A Reproducible Model to Induce Experimental Allodynia and Hyperalgesia.', *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 16(1), pp. 12–23. doi: 10.1111/papr.12267.

Ängeby Möller, K. *et al.* (2015) 'Using gait analysis to assess weight bearing in rats with Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis to improve predictivity: Interfering with the cyclooxygenase and nerve growth factor pathways.', *European journal of pharmacology*, 756, pp. 75–84. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.050.

Angelotti, F. et al. (2017) 'One year in review 2017: Pathogenesis of rheumatoid arthritis', *Clinical and Experimental Rheumatology*, pp. 0368–0378. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28631608 (Accessed: I August 2017).

Arend, W. P. and Firestein, G. S. (2012) 'Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis.', *Nature reviews. Rheumatology*, 8(10), pp. 573–86. doi: 10.1038/nrrheum.2012.134.

Arnett, F. C. et al. (1988) 'The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis', Arthritis & Rheumatism. John Wiley & Sons, Inc., 31(3), pp. 315–324. doi: 10.1002/art.1780310302.

Asaumi, K. et al. (2000) 'Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing', Bone, 26(6), pp. 625–633. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00281-7.

Augé, C., Chene, G., Dubourdeau, M., Desoubzdanne, D., Corman, B., Palea, S., ... Coelho, A.-M. (2013). Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *European Journal of Pharmacology*, 707(1–3), 32–40. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.008

Baddack, U. et al. (2013) 'A chronic model of arthritis supported by a strain-specific periarticular lymph node in BALB/c mice', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 1644. doi: 10.1038/ncomms2625.

Bannister, K., Kucharczyk, M. and Dickenson, A. H. (2017) 'Hopes for the Future of Pain Control', *Pain and Therapy*. Springer Healthcare, 6(2), pp. 117–128. doi: 10.1007/s40122-017-0073-6.

Bannwarth, B. and Kostine, M. (2017) 'Nerve Growth Factor Antagonists: Is the Future of Monoclonal Antibodies Becoming Clearer?', *Drugs*. doi: 10.1007/s40265-017-0781-6.

Barde, Y. A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1982) 'Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.', *The EMBO journal*, 1(5), pp. 549–53. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7188352 (Accessed: 28 May 2018).

Barker, P. A. (2004) 'p75NTR Is Positively Promiscuous', *Neuron*, 42(4), pp. 529–533. doi: 10.1016/j.neuron.2004.04.001.

Barra, L. et al. (2013) 'Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor fluctuate in early inflammatory arthritis and do not predict clinical outcomes.', *The Journal of rheumatology*, 40(8), pp. 1259–67. doi: 10.3899/jrheum.120736.

Le Bars, D., Dickenson, A. H. and Besson, J. M. (1979a) 'Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat.', *Pain*, 6(3), pp. 283–304. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/460935 (Accessed: 21 July 2018).

Le Bars, D., Dickenson, A. H. and Besson, J. M. (1979b) 'Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications.', *Pain*, 6(3), pp. 305–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/460936 (Accessed: 21 July 2018).

Barthel, C. et al. (2009) 'Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis.', Arthritis research & therapy. BioMed Central, 11(3), p. R82. doi: 10.1186/ar2716.

Bas, D. B., Su, J., Wigerblad, G., & Svensson, C. I. (2016). Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. *Pain Management*, 6(3), 265–284. https://doi.org/10.2217/pmt.16.4

Bas, S. (2005). Utilité des anticorps antiprotéines citrullinées dans le diagnostic et le pronostic de la polyarthrite rhumatoïde. Retrieved January 24, 2018, from https://www.revmed.ch/RMS/2005/RMS-10/30229

Basbaum, A. I. et al. (2009) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Pain', Cell, 139(2), pp. 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

Bax, B. et al. (1997) 'Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins.', *Structure* (London, England: 1993), 5(10), pp. 1275–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351801 (Accessed: 19 July 2018).

van Beers, J. J. B. C. et al. (2013) 'ACPA fine-specificity profiles in early rheumatoid arthritis patients do not

correlate with clinical features at baseline or with disease progression.', Arthritis research & therapy, 15(5), p. R140. doi: 10.1186/ar4322.

Bera-Louville, A. (2003) 'Concept de neuroplasticité : application à la douleur chronique', *Revue du Rhumatisme*. Elsevier Masson, 70(4), pp. 327–330. doi: 10.1016/S1169-8330(03)00103-0.

Bergmann, I. et al. (1998) 'Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75.', *Neuroscience letters*, 255(2), pp. 87–90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835221 (Accessed: 28 June 2018).

Bergstra, S. A. and Allaart, C. F. (2018) 'What is the optimal target for treat-to-target strategies in rheumatoid arthritis?', *Current Opinion in Rheumatology*, p. 1. doi: 10.1097/BOR.0000000000484.

Berkemeier, L. R. et al. (1991) 'Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB.', *Neuron*, 7(5), pp. 857–66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1742028 (Accessed: 19 July 2018).

Berner, J. and Gabay, C. (2014) 'Le bon usage de la prednisone dans la polyarthrite rhumatoïde - Revue Médicale Suisse', *Revue Médicale Suisse*, 10, pp. 603–608. Available at: https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Le-bon-usage-de-la-prednisone-dans-la-polyarthrite-rhumatoide (Accessed: 13 April 2018).

Berry, A., Bindocci, E. and Alleva, E. (2012) 'NGF, brain and behavioral plasticity.', *Neural plasticity*, 2012, p. 784040. doi: 10.1155/2012/784040.

Berthelot, J.-M. et al. (2017) 'NETose : au carrefour des polyarthrites rhumatoïdes, lupus et vascularites', Revue du Rhumatisme. Elsevier Masson, 84(4), pp. 274–281. doi: 10.1016/J.RHUM.2017.02.002.

Bijlsma, J. W. J. and Jacobs, J. W. G. (2014) 'Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis: still used after 65 years', Annals of the New York Academy of Sciences, 1318(1), pp. 27–31. doi: 10.1111/nyas.12394.

Bijlsma, J. W. J., Jacobs, J. W. G. and Buttgereit, F. (2015) 'Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis.', *Clinical and experimental rheumatology*, 33(4 Suppl 92), pp. S34-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457916 (Accessed: 27 March 2018).

Bîlc, M. I. et al. (2018) 'Childhood trauma and emotion regulation: The moderator role of BDNF Val66Met', Neuroscience Letters, 685, pp. 7–11. doi: 10.1016/j.neulet.2018.07.018.

Blanchard, M. G., Rash, L. D. and Kellenberger, S. (2012) 'Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2.', *British journal of pharmacology*, 165(7), pp. 2167–77. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01674.x.

Bonnington, J. K. and McNaughton, P. A. (2003) 'Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor.', *The Journal of physiology*, 551(Pt 2), pp. 433–46. doi: 10.1113/jphysiol.2003.039990.

Borbiro, I. and Rohacs, T. (2017) 'Regulation of Piezo Channels by Cellular Signaling Pathways', in *Current topics in membranes*, pp. 245–261. doi: 10.1016/bs.ctm.2016.10.002.

Bos, W. H. et al. (2010) 'Arthritis development in patients with arthralgia is strongly associated with anticitrullinated protein antibody status: a prospective cohort study.', Annals of the rheumatic diseases, 69(3), pp. 490–4. doi: 10.1136/ard.2008.105759.

Bottini, N. and Firestein, G. S. (2013) 'Epigenetics in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Rheumatologists', *Current Rheumatology Reports*, 15(11), p. 372. doi: 10.1007/s11926-013-0372-9.

Bouhassira, D. et al. (2005) 'Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4)', *Pain*, 114(1), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.pain.2004.12.010.

Bracci-Laudiero, L. and De Stefano, M. E. (2015) 'NGF in Early Embryogenesis, Differentiation, and Pathology in the Nervous and Immune Systems', in *Current topics in behavioral neurosciences*, pp. 125–152. doi: 10.1007/7854_2015_420.

Brennan, T. J. (2011). Pathophysiology of postoperative pain. *Pain*, *152*(Supplement), S33–S40. https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.11.005

Brierley, S. M. et al. (2011) 'TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity.', *The Journal of physiology*. Wiley-Blackwell, 589(Pt 14), pp. 3575–93. doi: 10.1113/jphysiol.2011.206789.

Bron, R. *et al.* (2003) 'Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type I in sensory neurons by neurotrophic factors.', *Molecular and cellular neurosciences*, 22(1), pp. 118–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595244 (Accessed: 12 August 2018).

Brown, P. M., Pratt, A. G. and Isaacs, J. D. (2016) 'Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis and the search for biomarkers', *Nature Reviews Rheumatology*, 12(12), pp. 731–742. doi: 10.1038/nrrheum.2016.175.

Bugatti, S. et al. (2014) 'B Cells in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenic Players to Disease Biomarkers', BioMed Research International, 2014, pp. 1–14. doi: 10.1155/2014/681678.

Bustamante, M. F. et al. (2017) 'Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.', Arthritis research & therapy. BioMed Central, 19(1), p. 110. doi: 10.1186/s13075-017-1303-3.

Cachin, F. et al. (2011) 'First ex vivo study demonstrating that 99mTc-NTP 15-5 radiotracer binds to human articular cartilage', European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Springer-Verlag, 38(11), pp. 2077–2082. doi: 10.1007/s00259-011-1890-1.

Calabrò, A. et al. (2016) 'One year in review 2016: Novelties in the treatment of rheumatoid arthritis', *Clinical and Experimental Rheumatology*, pp. 357–372. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268779 (Accessed: | August 2017).

Calvino, B. (2006) '[Neural basis of pain].', *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement*, 4(1), pp. 7–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556514 (Accessed: 9 July 2018).

Cao, Y. Q. et al. (1998) 'Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain.', *Nature*, 392(6674), pp. 390–4. doi: 10.1038/32897.

Capsoni, S. et al. (2011) 'Taking Pain Out of NGF: A "Painless" NGF Mutant, Linked to Hereditary Sensory Autonomic Neuropathy Type V, with Full Neurotrophic Activity', *PLoS ONE*. Edited by F. Tell. Public Library of Science, 6(2), p. e17321. doi: 10.1371/journal.pone.0017321.

Carrasco, D. I. and English, A. W. (2003) 'Neurotrophin 4/5 is required for the normal development of the slow muscle fiber phenotype in the rat soleus.', *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 13), pp. 2191–200. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771168 (Accessed: 25 July 2018).

Carvalho, O. P. et al. (2011) 'A novel NGF mutation clarifies the molecular mechanism and extends the phenotypic spectrum of the HSAN5 neuropathy.', *Journal of medical genetics*. BMJ Publishing Group Ltd, 48(2), pp. 131–5. doi: 10.1136/jmg.2010.081455.

Caspani, O. and Heppenstall, P. A. (2009) 'TRPA1 and cold transduction: an unresolved issue?', The Journal of general physiology, 133(3), pp. 245–9. doi: 10.1085/jgp.200810136.

Castañeda-Corral, G. et al. (2011) 'The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A', *Neuroscience*, 178, pp. 196–207. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.01.039.

Chang, D. S., Hsu, E., Hottinger, D. G., & Cohen, S. P. (2016). Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence. *Journal of Pain Research*, 9, 373–83. https://doi.org/10.2147/JPR.S89061

Di Castro, A. et al. (2006) 'Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways.', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences, 103(12), pp. 4699–704. doi: 10.1073/pnas.0508005103.

Caterina, M. J. et al. (1997) 'The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.', Nature, 389(6653), pp. 816–824. doi: 10.1038/39807.

Caterina, M. J. et al. (2000) 'Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.', Science (New York, N.Y.), 288(5464), pp. 306–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764638 (Accessed: 17 September 2018).

Catrina, A. I. et al. (2014) 'Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis', Nature Reviews Rheumatology, 10(11), pp. 645–653. doi: 10.1038/nrrheum.2014.115.

Catrina, A. I. et al. (2017) 'Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 13(2), pp. 79–86. doi: 10.1038/nrrheum.2016.200.

Catrina, A. I., Deane, K. D. and Scher, J. U. (2016) 'Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis.', *Rheumatology* (*Oxford, England*), 55(3), pp. 391–402. doi:

10.1093/rheumatology/keu469.

Cavanaugh, D. J. et al. (2009) 'Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(22), pp. 9075–80. doi: 10.1073/pnas.0901507106.

Chalan, P. et al. (2016) 'Analysis of serum immune markers in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis and in high-risk seropositive arthralgia patients.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 26021. doi: 10.1038/srep26021.

Chan, J. R. et al. (2001) 'Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system', Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(25), pp. 14661–14668. doi: 10.1073/pnas.251543398.

Chang, D. S. et al. (2016) 'Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence.', Journal of pain research. Dove Press, 9, pp. 373–83. doi: 10.2147/JPR.S89061.

Chang, K. et al. (2014) 'Smoking and rheumatoid arthritis.', International journal of molecular sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 15(12), pp. 22279–95. doi: 10.3390/ijms151222279.

Chao, M. V et al. (1986) 'Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor.', Science (New York, N.Y.), 232(4749), pp. 518–21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3008331 (Accessed: 22 July 2018).

Chao, M. V (2003) 'Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.', *Nature reviews. Neuroscience*, 4(4), pp. 299–309. doi: 10.1038/nrn1078.

Chao, M. V and Hempstead, B. L. (1995) 'p75 and Trk: a two-receptor system.', *Trends in neurosciences*, 18(7), pp. 321–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7571013 (Accessed: 22 July 2018).

Chartier, S. R. et al. (2017) 'Immunohistochemical localization of nerve growth factor, tropomyosin receptor kinase A, and p75 in the bone and articular cartilage of the mouse femur', *Molecular Pain*, 13, p. 174480691774546. doi: 10.1177/1744806917745465.

Chen, K.-H. et al. (2014) 'Pulsed radiofrequency reduced complete Freund's adjuvant-induced mechanical hyperalgesia via the spinal c-Jun N-terminal kinase pathway.', *Cellular and molecular neurobiology*, 34(2), pp. 195–203. doi: 10.1007/s10571-013-0003-z.

Chen, L. W. et al. (2008) 'The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease.', CNS & neurological disorders drug targets, 7(6), pp. 512–23. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128208 (Accessed: 23 July 2018).

Cheng, Y.-R., Jiang, B.-Y. and Chen, C.-C. (2018) 'Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemosensing and mechano-sensing', *Journal of Biomedical Science*, 25(1), p. 46. doi: 10.1186/s12929-018-0448-y.

Chuang, H. H. et al. (2001) 'Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition.', *Nature*, 411(6840), pp. 957–62. doi: 10.1038/35082088.

Clavel, C. et al. (2008) 'Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen.', Arthritis and rheumatism, 58(3), pp. 678–88. doi: 10.1002/art.23284.

Coggeshall, R. E. *et al.* (1983) 'Discharge characteristics of fine medial articular afferents at rest and during passive movements of inflamed knee joints.', *Brain research*, 272(1), pp. 185–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6311338 (Accessed: 11 July 2018).

Cohen, S. (1960) 'Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(3), pp. 302–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16578483 (Accessed: 19 July 2018).

Colebatch, A. N. et al. (2013) 'EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis', Annals of the Rheumatic Diseases, 72(6), pp. 804–814. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203158.

Conner, J. M. et al. (2009) 'NGF is essential for hippocampal plasticity and learning.', The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. NIH Public Access, 29(35), pp. 10883–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2594-09.2009.

Conover, J. C. et al. (1995) 'Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4', *Nature*, 375(6528), pp. 235–238. doi: 10.1038/375235a0.

Coppola, V. et al. (2001) 'Dissection of NT3 functions in vivo by gene replacement strategy', Development, 128(21). Available at: http://dev.biologists.org/content/128/21/4315.long (Accessed: 17 July 2017).

Cosgaya, J. M., Chan, J. R. and Shooter, E. M. (2002) 'The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination.', *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), pp. 1245–8. doi: 10.1126/science.1076595.

da Costa, D. S. M. et al. (2010) 'The involvement of the transient receptor potential AI (TRPAI) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation.', *Pain*, 148(3), pp. 431–7. doi: 10.1016/j.pain.2009.12.002.

Coste, B. et al. (2010) 'Piezo I and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels.', *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), pp. 55–60. doi: 10.1126/science.1193270.

Costenbader, K. H. et al. (2006) 'Smoking Intensity, Duration, and Cessation, and the Risk of Rheumatoid Arthritis in Women', The American Journal of Medicine, 119(6), p. 503.e1-503.e9. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.09.053.

Coulson, E. J. et al. (2004) 'The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling', in *Progress in brain research*, pp. 41–62. doi: 10.1016/S0079-6123(03)46003-2.

Coutaux, A. et al. (2005) 'Hyperalgésie et allodynie : les mécanismes périphériques', Revue du Rhumatisme, 72(9), pp. 770–783. doi: 10.1016/j.rhum.2004.01.011.

Cowin, S. C. and Hegedus, D. H. (1976) 'Bone remodeling I: theory of adaptive elasticity', *Journal of Elasticity*. Kluwer Academic Publishers, 6(3), pp. 313–326. doi: 10.1007/BF00041724.

Cross, M. et al. (2014) 'The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study', Annals of the Rheumatic Diseases, 73(7), pp. 1316–1322. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204627.

Crowley, C. et al. (1994) 'Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons.', *Cell*, 76(6), pp. 1001–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137419 (Accessed: 18 June 2018).

Danziger, N. (2009) 'L'insensibilité congénitale à la douleur', *Neurologie.com*, I(4), pp. 122–124. doi: 10.1684/NRO.2009.0060.

Das, S. and Padhan, P. (2017) 'An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management.', *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 8(3), pp. 81–86. doi: 10.4103/jpp.JPP_194_16.

Davila, L. and Ranganathan, P. (2011) 'Pharmacogenetics: implications for therapy in rheumatic diseases', *Nature Reviews Rheumatology*, 7(9), pp. 537–550. doi: 10.1038/nrrheum.2011.117.

Davis, K. D. et al. (2017) 'Brain imaging tests for chronic pain: medical, legal and ethical issues and recommendations.', Nature reviews. Neurology, 13(10), pp. 624–638. doi: 10.1038/nrneurol.2017.122.

de Hair, M. J. H., van de Sande, M. G. H., Ramwadhdoebe, T. H., Hansson, M., Landewé, R., van der Leij, C., ... Tak, P. P. (2014). Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis: implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(3), 513–22. https://doi.org/10.1002/art.38273

Deal, C. (2012) 'Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal.', *Current rheumatology* reports, 14(3), pp. 231–7. doi: 10.1007/s11926-012-0253-7.

Deane, K. D. et al. (2010) 'The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner.', Arthritis and rheumatism, 62(11), pp. 3161–72. doi: 10.1002/art.27638.

Dejean and Richard (2013) 'Mécanismes d'action des glucocorticoïdes', *La Revue de Médecine Interne*. Elsevier Masson, 34(5), pp. 264–268. doi: 10.1016/J.REVMED.2013.02.021.

Delcroix, J.-D. et al. (2003) 'NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals.', *Neuron*, 39(1), pp. 69–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848933 (Accessed: 21 July 2018).

Delmas, P., Hao, J. and Rodat-Despoix, L. (2011) 'Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 12(3), pp. 139–153. doi: 10.1038/nrn2993.

Demoruelle, M. K. et al. (2017) 'Anti-Citrullinated Protein Antibodies Are Associated With Neutrophil Extracellular Traps in the Sputum in Relatives of Rheumatoid Arthritis Patients.', Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.), 69(6), pp. 1165–1175. doi: 10.1002/art.40066.

Demoruelle, M. K., Deane, K. D. and Holers, V. M. (2014) 'When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis?', *Current opinion in rheumatology*. NIH Public Access, 26(1), pp. 64–71. doi: 10.1097/BOR.0000000000017.

Denk, F., Bennett, D. L. and McMahon, S. B. (2017) 'Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms', Annual Review of Neuroscience, 40(1), pp. 307–325. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031121.

Deval, E. et al. (2008) 'ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain', The EMBO Journal, 27(22), pp. 3047–3055. doi: 10.1038/emboj.2008.213.

Deval, E. et al. (2011) 'Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain', Journal of Neuroscience, 31(16), pp. 6059–6066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5266-10.2011.

Deval, E. and Lingueglia, E. (2015) 'Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems', *Neuropharmacology*, 94, pp. 49–57. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.02.009.

Dhondt, W. et al. (1999) 'Pain threshold in patients with rheumatoid arthritis and effect of manual oscillations.', Scandinavian journal of rheumatology, 28(2), pp. 88–93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229137 (Accessed: 31 August 2018).

Dieudé, P. and Cornélis, F. (2005) 'Génétique de la polyarthrite rhumatoïde', *Revue du Rhumatisme*, pp. 310–316. Available at: http://www.rhumatologie.asso.fr/05-Bibliotheque/Publications/pub-72-310-316.asp (Accessed: 16 January 2018).

Diochot, S. et al. (2004) 'A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons', *The EMBO Journal*, 23(7), pp. 1516–1525. doi: 10.1038/sj.emboj.7600177.

Djouhri, L., & Lawson, S. N. (2004). Aβ-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews*, 46(2), 131–145. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.015

Doody, K. M., Bottini, N. and Firestein, G. S. (2017) 'Epigenetic alterations in rheumatoid arthritis fibroblastlike synoviocytes.', *Epigenomics*, 9(4), pp. 479–492. doi: 10.2217/epi-2016-0151.

Dubin, A. E. and Patapoutian, A. (2010) 'Nociceptors: the sensors of the pain pathway', Journal of Clinical Investigation, 120(11), pp. 3760–3772. doi: 10.1172/JCI42843.

Dyck, P. J. et al. (1997) 'Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans.', *Neurology*, 48(2), pp. 501–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040746 (Accessed: I August 2017).

Edwards, R. H., Selby, M. J. and Rutter, W. J. (1986) 'Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors.', *Nature*, 319(6056), pp. 784–7. doi: 10.1038/319784a0.

Egan, M. F. et al. (2003) 'The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function.', *Cell.* Elsevier, 112(2), pp. 257–69. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00035-7.

Eid, S. R. et al. (2008) 'HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathyinduced mechanical hypersensitivity.', *Molecular pain*, 4, p. 48. doi: 10.1186/1744-8069-4-48.

Einarsdottir, E. et al. (2004) 'A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception', *Human Molecular Genetics*, 13(8), pp. 799–805. doi: 10.1093/hmg/ddh096.

Ernfors, P. et al. (1994) 'Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents.', *Cell*, 77(4), pp. 503–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514502 (Accessed: 19 July 2018).

Eskander, M. A. et al. (2015) 'Persistent Nociception Triggered by Nerve Growth Factor (NGF) Is Mediated by TRPVI and Oxidative Mechanisms.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(22), pp. 8593–603. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3993-14.2015.

Evans, R. J. et al. (2011) 'Proof of concept trial of tanezumab for the treatment of symptoms associated with interstitial cystitis.', The Journal of urology, 185(5), pp. 1716–21. doi: 10.1016/j.juro.2010.12.088.

Ferro, F. et al. (2017) 'One year in review 2017: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis.', *Clinical and experimental rheumatology*, 35(5), pp. 721–734. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28956527 (Accessed: 13 April 2018).

Firestein, G. S. and McInnes, I. B. (2017) 'Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis.', *Immunity*, 46(2), pp. 183–196. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006.

Fleischmann, R. et al. (2017) 'Baricitinib, Methotrexate, or Combination in Patients With Rheumatoid Arthritis and No or Limited Prior Disease-Modifying Antirheumatic Drug Treatment', Arthritis & Rheumatology, 69(3), pp. 506–517. doi: 10.1002/art.39953.

Flodin, P. et al. (2016) 'Intrinsic Brain Connectivity in Chronic Pain: A Resting-State fMRI Study in Patients with Rheumatoid Arthritis', *Frontiers in Human Neuroscience*, 10, p. 107. doi: 10.3389/fnhum.2016.00107.

Frisell, T. et al. (2013) 'Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anticitrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age.', Arthritis and rheumatism, 65(11), pp. 2773–82. doi: 10.1002/art.38097.

Frisell, T., Saevarsdottir, S. and Askling, J. (2016) 'Family history of rheumatoid arthritis: an old concept with new developments.', *Nature reviews. Rheumatology*, 12(6), pp. 335–43. doi: 10.1038/nrrheum.2016.52.

Gabay, C. et al. (2014) 'Biological agents in monotherapy for the treatment of rheumatoid arthritis', Swiss Medical Weekly, 144, p. w13950. doi: 10.4414/smw.2014.13950.

Gao, Y.-J. et al. (2010) 'The c-Jun N-terminal kinase I (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition.', *Pain*, 148(2), pp. 309–19. doi: 10.1016/j.pain.2009.11.017.

Gao, Y.-J. and Ji, R.-R. (2010) 'Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia.', *Journal of neurochemistry*, 115(2), pp. 505–14. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06946.x.

García-Fernández, E. et al. (2009) 'Differences in Pressure-Pain Threshold Between Healthy Women and Patients with Fibromyalgia Syndrome, Systemic Lupus Erythematosus, and Rheumatoid Arthritis', Journal of Musculoskeletal Pain. Taylor & Francis, 17(2), pp. 139–154. doi: 10.1080/10582450902820556.

Garip, Y. et al. (2015) 'Prevalence of Neuropathic Pain in Rheumatic Disorders: Association With Disease Activity, Functional Status and Quality of Life', Archives of Rheumatology. Turkish League Against Rheumatism, 30(3), pp. 231–237. doi: 10.5606/ArchRheumatol.2015.5295.

Gaujoux-Viala, C. (2017) 'Évaluation de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde', *Revue du Rhumatisme Monographies*. Elsevier Masson, 84(4), pp. 343–346. doi: 10.1016/J.MONRHU.2017.08.004.

Geller, B. et al. (2004) 'Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype.', *The American journal of psychiatry*, 161(9), pp. 1698–700. doi: 10.1176/appi.ajp.161.9.1698.

Ghilardi, J. R. et al. (2012) 'Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint.', Arthritis and rheumatism, 64(7), pp. 2223–32. doi: 10.1002/art.34385.

Di Giovine, F. S., Nuki, G. and Duff, G. W. (1988) 'Tumour necrosis factor in synovial exudates.', *Annals of the rheumatic diseases*, 47(9), pp. 768–72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263088 (Accessed: 16 April 2018).

Di Giuseppe, D. et al. (2013) 'Cigarette smoking and smoking cessation in relation to risk of rheumatoid arthritis in women.', Arthritis research & therapy. BioMed Central, 15(2), p. R56. doi: 10.1186/ar4218.

Gladman (2008) Les traumatismes et l'arthrite inflammatoire. Available at: http://www.wsiat.on.ca/french/mlo/farthritis.htm (Accessed: 15 January 2018).

Gold, M. S., & Gebhart, G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, 16(11), 1248–57. https://doi.org/10.1038/nm.2235

Goldring, S. R. (2003) 'Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis.', *Rheumatology* (Oxford, England), 42 Suppl 2(90002), pp. ii11-6. doi: 10.1093/rheumatology/keg327.

Gorokhova, S. et al. (2014) 'Uncoupling of molecular maturation from peripheral target innervation in nociceptors expressing a chimeric TrkA/TrkC receptor.', *PLoS genetics*. Public Library of Science, 10(2), p. e1004081. doi: 10.1371/journal.pgen.1004081.

Grabiec, A. M. et al. (2012) 'Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay.', Annals of the rheumatic diseases, 71(3), pp. 424–31. doi: 10.1136/ard.2011.154211.

Gregersen, P. K., Silver, J. and Winchester, R. J. (1987) 'The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.', *Arthritis and rheumatism*, 30(11), pp. 1205–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446635 (Accessed: 5 March 2018).

Gruen, M. E. et al. (2016) 'A Feline-Specific Anti-Nerve Growth Factor Antibody Improves Mobility in Cats with Degenerative Joint Disease-Associated Pain: A Pilot Proof of Concept Study', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), pp. 1138–1148. doi: 10.1111/jvim.13972.

Guerios, S. D. et al. (2008) 'Blockade of NGF and trk receptors inhibits increased peripheral mechanical sensitivity accompanying cystitis in rats.', American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 295(1), pp. R111-22. doi: 10.1152/ajpregu.00728.2007.

Guillemin, F. et al. (2005) 'Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001', Annals of the Rheumatic Diseases, 64(10), pp. 1427–1430. doi: 10.1136/ard.2004.029199.

Gul'neva, M. I. and Noskov, S. M. (2011) '[Colonic microbial biocenosis in rheumatoid arthritis].', *Klinicheskaia meditsina*, 89(4), pp. 45–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932563 (Accessed: 19 January 2018).

Hallböök, F., Ibáñez, C. F. and Persson, H. (1991) 'Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary.', *Neuron*, 6(5), pp. 845–58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025430 (Accessed: 19 July 2018).

Halvorson, K. G. et al. (2005) 'A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone.', *Cancer research*, 65(20), pp. 9426–35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0826.

Hammaker, D. and Firestein, G. S. (2018) 'Epigenetics of inflammatory arthritis', *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), pp. 188–196. doi: 10.1097/BOR.0000000000471.

Hardy, J. D., Woolf, H. G. and Goodell, H. (1950) 'Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia.', *The Journal of clinical investigation*, 29(1), pp. 115–40. doi: 10.1172/JCI102227.

Harre, U. et al. (2012) 'Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin.', The Journal of clinical investigation, 122(5), pp. 1791–802. doi: 10.1172/JCI60975.

Harre, U., Kittan, N. A. and Schett, G. (2014) 'Autoantibody-mediated bone loss.', *Current osteoporosis reports*, 12(1), pp. 17–21. doi: 10.1007/s11914-013-0185-9.

Hayashi, K. et al. (2013) 'Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation, and expanded pain areas', *Pain*, 154(11), pp. 2344–2352. doi: 10.1016/j.pain.2013.07.007.

Hazlewood, G. S. et al. (2016) 'Methotrexate monotherapy and methotrexate combination therapy with traditional and biologic disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis: abridged Cochrane systematic review and network meta-analysis.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 353, p. i1777. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102806 (Accessed: 26 January 2018).

Hedström, A. K. et al. (2018) 'Smoking and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Swedish population-based case-control study', European Journal of Epidemiology. doi: 10.1007/s10654-018-0360-5.

Heiberg, T. and Kvien, T. K. (2002) 'Preferences for improved health examined in 1,024 patients with rheumatoid arthritis: pain has highest priority.', *Arthritis and rheumatism*, 47(4), pp. 391–7. doi: 10.1002/art.10515.

Hemingway, F. et al. (2011) 'RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II', Bone, 48(4), pp. 938–944. doi: 10.1016/j.bone.2010.12.023.

Hempstead, B. L. (2015) 'Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions.', *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 126, pp. 9–19. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26330656 (Accessed: 18 July 2018).

Henry, D. E., Chiodo, A. E. and Yang, W. (2011) 'Central Nervous System Reorganization in a Variety of Chronic Pain States: A Review', *PM&R*, 3(12), pp. 1116–1125. doi: 10.1016/j.pmrj.2011.05.018.

Heppelmann, B. and McDougall, J. J. (2005) 'Inhibitory effect of amiloride and gadolinium on fine afferent nerves in the rat knee: evidence of mechanogated ion channels in joints.', *Experimental brain research*, 167(1), pp. 114–8. doi: 10.1007/s00221-005-0040-z.

Herrero, J. F., Laird, J. M. and López-García, J. A. (2000) 'Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something?', *Progress in neurobiology*, 61(2), pp. 169–203. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704997 (Accessed: 5 July 2018).

Herz, B. et al. (2014) 'Osteitis and synovitis, but not bone erosion, is associated with proteoglycan loss and microstructure damage in the cartilage of patients with rheumatoid arthritis.', Annals of the rheumatic diseases, 73(6), pp. 1101–6. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202850.

Hirose, M., Kuroda, Y. and Murata, E. (2016) 'NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain.', Pain practice : the official journal of World Institute of Pain, 16(2), pp. 175–82. doi: 10.1111/papr.12342.

Hirth, M. et al. (2013) 'Nerve growth factor induces sensitization of nociceptors without evidence for increased intraepidermal nerve fiber density.', *Pain*, 154(11), pp. 2500–11. doi: 10.1016/j.pain.2013.07.036.

Hochberg, M. C. et al. (2007) Rheumatology.

Hochberg, M. C. (2015) 'Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies.', *Osteoarthritis and cartilage*, 23 Suppl I, pp. S18-21. doi: 10.1016/j.joca.2014.10.005.

Hohn, A. *et al.* (1990) 'Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brainderived neurotrophic factor family', *Nature*, 344(6264), pp. 339–341. doi: 10.1038/344339a0.

Hori, K. et al. (2010) 'Upregulations of P2X(3) and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats.', Pain, 149(2), pp. 393–405. doi: 10.1016/j.pain.2010.03.005.

Horváth, Á. et al. (2016) 'Transient receptor potential ankyrin I (TRPAI) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPAI-deficient mice.', Arthritis research & therapy, 18(1), p. 6. doi: 10.1186/s13075-015-0904-y.

Hsieh, W.-S. et al. (2017) 'TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 8870. doi: 10.1038/s41598-017-09200-6.

Huang, J., Zhang, X. and McNaughton, P. A. (2006) 'Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia.', *Current neuropharmacology*. Bentham Science Publishers, 4(3), pp. 197–206. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615146 (Accessed: 7 August 2018).

Hughes, G. C. and Choubey, D. (2014) 'Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone', *Nature Reviews Rheumatology*, 10(12), pp. 740–751. doi: 10.1038/nrrheum.2014.144.

I Keen, H., Conaghan, P. G. and Tett, S. E. (2013) 'Safety evaluation of leflunomide in rheumatoid arthritis', *Expert Opinion on Drug Safety*, 12(4), pp. 581–588. doi: 10.1517/14740338.2013.798299.

Ikeda, F. et al. (2004) 'Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation.', *The Journal of clinical investigation*, 114(4), pp. 475–84. doi: 10.1172/JCI19657.

Ikeuchi, M. et al. (2008) 'Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice.', Pain, 137(3), pp. 662–9. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.020.

Ikeuchi, M., Kolker, S. J. and Sluka, K. A. (2009) 'Acid-Sensing Ion Channel 3 Expression in Mouse Knee Joint Afferents and Effects of Carrageenan-Induced Arthritis', *The Journal of Pain*, 10(3), pp. 336–342. doi: 10.1016/j.jpain.2008.10.010.

Indo, Y. et al. (1996) 'Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis', *Nature Genetics*, 13(4), pp. 485–488. doi: 10.1038/ng0896-485.

Indo, Y. *et al.* (1997) 'Structure and organization of the human TRKA gene encoding a high affinity receptor for nerve growth factor.', *The Japanese journal of human genetics*, 42(2), pp. 343–51. doi: 10.1007/BF02766957.

Ingegnoli, F., Castelli, R. and Gualtierotti, R. (2013) 'Rheumatoid factors: clinical applications.', *Disease markers*. Hindawi, 35(6), pp. 727–34. doi: 10.1155/2013/726598.

Isaacs, J. D. (2008) 'Therapeutic T-cell manipulation in rheumatoid arthritis: past, present and future.', *Rheumatology (Oxford, England)*, 47(10), pp. 1461–8. doi: 10.1093/rheumatology/ken163.

Isaacs, J. D. (2010) 'The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all?', Nature reviews.

Immunology, 10(8), pp. 605–11. doi: 10.1038/nri2804.

Izumi, M. et al. (2012) 'Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis.', *Journal of biomedical science*, 19(1), p. 77. doi: 10.1186/1423-0127-19-77.

Jahr, H. et al. (2005) 'Identification of acid-sensing ion channels in bone.', Biochemical and biophysical research communications, 337(1), pp. 349–54. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.054.

Jensen, J. E. *et al.* (2014) 'Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores.', *Journal of medicinal chemistry*, 57(21), pp. 9195–203. doi: 10.1021/jm501400p.

Ji, R.-R. et al. (2002) 'p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPVI levels and maintains heat hyperalgesia.', *Neuron*, 36(1), pp. 57–68. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367506 (Accessed: 31 May 2018).

Jimenez-Andrade, J. M. et al. (2011) 'Preventive or late administration of anti-NGF therapy attenuates tumorinduced nerve sprouting, neuroma formation, and cancer pain.', *Pain*, 152(11), pp. 2564–74. doi: 10.1016/j.pain.2011.07.020.

Jimenez-Andrade, J. M. and Mantyh, P. W. (2012) 'Sensory and sympathetic nerve fibers undergo sprouting and neuroma formation in the painful arthritic joint of geriatric mice', *Arthritis Research & Therapy*, 14(3), p. R101. doi: 10.1186/ar3826.

Jones, K. R. et al. (1994) 'Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development.', *Cell*, 76(6), pp. 989–99. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137432 (Accessed: 19 July 2018).

Jones, K. R. and Reichardt, L. F. (1990) 'Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 87(20), pp. 8060–4. doi: 10.1073/PNAS.87.20.8060.

Julius, D. (2013) 'TRP Channels and Pain', Annual Review of Cell and Developmental Biology, 29(1), pp. 355–384. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833.

Julius, D. and Basbaum, A. I. (2001) 'Molecular mechanisms of nociception', *Nature 2001 413:6852*. Nature Publishing Group. Available at: https://www.nature.com/articles/35093019 (Accessed: 30 April 2018).

Kalcheim, C., Carmeli, C. and Rosenthal, A. (1992) 'Neurotrophin 3 is a mitogen for cultured neural crest cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), pp. 1661–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1542658 (Accessed: 22 July 2018).

Källberg, H., Ding, B., Padyukov, L., Bengtsson, C., Rönnelid, J., Klareskog, L., Alfredsson, L. and EIRA Study Group, E. study (2011) 'Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke.', *Annals of the rheumatic diseases*. NIH Public Access, 70(3), pp. 508–11. doi: 10.1136/ard.2009.120899.

Kalliolias, G. D. and Ivashkiv, L. B. (2016) 'TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies', *Nature Reviews Rheumatology*, 12(1), pp. 49–62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.

Kaltsonoudis, E., Papagoras, C. and Drosos, A. A. (2012) 'Current and Future Role of Methotrexate in the Therapeutic Armamentarium for Rheumatoid Arthritis', *International Journal of Clinical Rheumatology*, pp. 179–189. Available at: https://www.medscape.com/viewarticle/761828 (Accessed: 26 January 2018).

Kaplan, D. R., Martin-Zanca, D. and Parada, L. F. (1991) 'Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF', *Nature*, 350(6314), pp. 158–160. doi: 10.1038/350158a0.

Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2000) 'Neurotrophin signal transduction in the nervous system.', *Current opinion in neurobiology*, 10(3), pp. 381–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851172 (Accessed: 20 July 2018).

Karczewski, J. et al. (2010) 'Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2', British Journal of Pharmacology, 161(4), pp. 950–960. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00918.x.

Karouzakis, E. et al. (2011) 'DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.', Genes and immunity, 12(8), pp. 643–52. doi: 10.1038/gene.2011.45.

Katz, N. et al. (2011) 'Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of chronic low back pain', Pain, 152(10), pp. 2248–2258. doi: 10.1016/j.pain.2011.05.003.

Kayama, Y. et al. (2017) 'Signaling Pathways Relevant to Nerve Growth Factor-induced Upregulation of Transient Receptor Potential M8 Expression', *Neuroscience*, 367, pp. 178–188. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.10.037.

Kays, J. *et al.* (2018) 'Peripheral Synthesis of an Atypical Protein Kinase C Mediates the Enhancement of Excitability and the Development of Mechanical Hyperalgesia Produced by Nerve Growth Factor', *Neuroscience*, 371, pp. 420–432. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.030.

Keating, G. M. (2013) 'Abatacept: A Review of its Use in the Management of Rheumatoid Arthritis', Drugs, 73(10), pp. 1095–1119. doi: 10.1007/s40265-013-0080-9.

Keffer, J. et al. (1991) 'Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis.', *The EMBO journal*, 10(13), pp. 4025–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1721867 (Accessed: 25 April 2018).

Kerr, B. J. et al. (1999) 'Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDAevoked responses in the rat spinal cord.', The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 19(12), pp. 5138–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366647 (Accessed: 15 August 2018).

Kerr, B. J. et al. (2001) 'A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain.', *Neuroreport*, 12(14), pp. 3077–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568640 (Accessed: 7 August 2018).

Keystone, E. C. *et al.* (2015) 'Safety and efficacy of baricitinib at 24 weeks in patients with rheumatoid arthritis who have had an inadequate response to methotrexate.', *Annals of the rheumatic diseases*, 74(2), pp. 333–40. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206478.

Khairnar, A. et al. (2015) '99mTc-NTP 15-5 Imaging for Cartilage Involvement in Experimental Rheumatoid Arthritis: Comparison with Routinely Used Molecular Imaging Methods and Sensitivity to Chronic Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Treatment', *Journal of Nuclear Medicine*, 56(5), pp. 798–804. doi: 10.2967/jnumed.114.151415.

Khan, N. and Smith, M. (2015) 'Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology', *Molecules*, 20(6), pp. 10657–10688. doi: 10.3390/molecules200610657.

Khandpur, R. *et al.* (2013) 'NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis', *Science Translational Medicine*, 5(178), p. 178ra40-178ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.

Khodorova, A., Nicol, G. D. and Strichartz, G. (2013) 'The p75NTR signaling cascade mediates mechanical hyperalgesia induced by nerve growth factor injected into the rat hind paw', *Neuroscience*, 254, pp. 312–323. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.046.

Khodorova, A., Nicol, G. D. and Strichartz, G. (2017) 'The TrkA receptor mediates experimental thermal hyperalgesia produced by nerve growth factor: Modulation by the p75 neurotrophin receptor.', *Neuroscience*, 340, pp. 384–397. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.064.

Kim, G. W. et al. (2015) 'IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future', Archives of Pharmacal Research, 38(5), pp. 575–584. doi: 10.1007/s12272-015-0569-8.

Kim, J. Y. et al. (2014) 'The role of bone scintigraphy in the diagnosis of rheumatoid arthritis according to the 2010 ACR/EULAR classification criteria.', *Journal of Korean medical science*, 29(2), pp. 204–9. doi: 10.3346/jkms.2014.29.2.204.

Kirwan, J. R. et al. (2007) 'Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis', Cochrane Database of Systematic Reviews, (1), p. CD006356. doi: 10.1002/14651858.CD006356.

Klein, R. et al. (1991) 'The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3.', *Cell*, 66(2), pp. 395–403. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1649702 (Accessed: 21 July 2018).

Kleyer, A. et al. (2014) 'Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies.', Annals of the rheumatic diseases, 73(5), pp. 854–60. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202958.

Kocijan, R., Harre, U. and Schett, G. (2013) 'ACPA and Bone Loss in Rheumatoid Arthritis', *Current Rheumatology Reports*. Springer US, 15(10), p. 366. doi: 10.1007/s11926-013-0366-7.

Kokkonen, H. et al. (2010) 'Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis.', Arthritis and rheumatism, 62(2), pp. 383–91. doi: 10.1002/art.27186.

Konda Mohan, V. et al. (2017) 'HLA-DRBI shared epitope alleles in patients with rheumatoid arthritis: relation to autoantibodies and disease severity in a south Indian population.', *International journal of rheumatic diseases*, 20(10), pp. 1492–1498. doi: 10.1111/1756-185X.12948.

Korte, M. et al. (1995) 'Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor.', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(19), pp. 8856–60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568031 (Accessed: 25 July 2018).

Kotyla, P. J. (2018) 'Are Janus Kinase Inhibitors Superior over Classic Biologic Agents in RA Patients?', BioMed Research International, 2018, pp. 1–9. doi: 10.1155/2018/7492904.

Kraemer, B. R., Yoon, S. O. and Carter, B. D. (2014) 'The Biological Functions and Signaling Mechanisms of the p75 Neurotrophin Receptor', in *Handbook of experimental pharmacology*, pp. 121–164. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_6.

Krieger, N. S., Frick, K. K. and Bushinsky, D. A. (2004) 'Mechanism of acid-induced bone resorption.', *Current opinion in nephrology and hypertension*, 13(4), pp. 423–36. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199293 (Accessed: 28 September 2018).

Krishnamurthy, A. et al. (2016) 'Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss.', Annals of the rheumatic diseases, 75(4), pp. 721–9. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208093.

Krzeszinski, J. Y. et al. (2017) 'Lipid Osteoclastokines Regulate Breast Cancer Bone Metastasis.', Endocrinology, 158(3), pp. 477–489. doi: 10.1210/en.2016-1570.

Kuan, Y.-H. and Shyu, B.-C. (2016) 'Nociceptive transmission and modulation via P2X receptors in central pain syndrome.', *Molecular brain*. BioMed Central, 9(1), p. 58. doi: 10.1186/s13041-016-0240-4.

Kucyi, A. and Davis, K. D. (2015) 'The dynamic pain connectome', *Trends in Neurosciences*, 38(2), pp. 86–95. doi: 10.1016/j.tins.2014.11.006.

Kuner, R. and Flor, H. (2017) 'Structural plasticity and reorganisation in chronic pain', *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), pp. 20–30. doi: 10.1038/nrn.2016.162.

Kurki, P. et al. (1992) 'Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease.', Arthritis and rheumatism, 35(8), pp. 914–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379430 (Accessed: 19 April 2018).

Kurowska, W. et al. (2017) 'The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.', *Central-European journal of immunology*. Termedia Publishing, 42(4), pp. 390–398. doi: 10.5114/ceji.2017.72807.

Lamb, Y. N. and Deeks, E. D. (2018) 'Sarilumab: A Review in Moderate to Severe Rheumatoid Arthritis', *Drugs*, 78(9), pp. 929–940. doi: 10.1007/s40265-018-0929-z.

Lane, N. E. et al. (2010) 'Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee', New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society, 363(16), pp. 1521–1531. doi: 10.1056/NEJMoa0901510.

Lane, N. E., Webster, L. and Shiao-Ping, L. (2005) 'RN624 (anti-NGF) improves pain and function in subjects with moderate knee osteoarthritis: A phase i study', *Arthritis Rheum*, 52, p. S461.

Latremoliere, A. and Woolf, C. J. (2009) 'Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.', *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. NIH Public Access, 10(9), pp. 895–926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.

Lee, E. B. et al. (2014) 'Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis', New England Journal of Medicine, 370(25), pp. 2377–2386. doi: 10.1056/NEJMoa1310476.

Lee, F. S. and Chao, M. V. (2001) 'Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), pp. 3555–3560. doi: 10.1073/pnas.061020198.

Lee, K. F. et al. (1992) 'Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system.', *Cell*, 69(5), pp. 737–49. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317267 (Accessed: 25 July 2018).

Lee, S.-Y. et al. (2018) 'A Combination with Probiotic Complex, Zinc, and Coenzyme Q10 Attenuates Autoimmune Arthritis by Regulation of Th17/Treg Balance', *Journal of Medicinal Food*, 21(1), pp. 39–46. doi: 10.1089/jmf.2017.3952.

Lee, Y. C. *et al.* (2011) 'Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: a longitudinal observational study', *Arthritis Research & Therapy*, 13(3), p. R83. doi: 10.1186/ar3353.

Lee, Y. C. (2013) 'Effect and Treatment of Chronic Pain in Inflammatory Arthritis', *Current Rheumatology Reports*, 15(1), p. 300. doi: 10.1007/s11926-012-0300-4.

Lee, Y. C. et al. (2014) 'Subgrouping of patients with rheumatoid arthritis based on pain, fatigue, inflammation, and psychosocial factors.', Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.), 66(8), pp. 2006–14. doi: 10.1002/art.38682.

Leffler, A.-S. et al. (2002) 'Somatosensory perception and function of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in patients suffering from rheumatoid arthritis.', *European journal of pain (London, England)*, 6(2), pp. 161–76. doi: 10.1053/eujp.2001.0313.

Legha, W. et al. (2010) 'stac1 and stac2 genes define discrete and distinct subsets of dorsal root ganglia neurons', Gene Expression Patterns, 10(7–8), pp. 368–375. doi: 10.1016/j.gep.2010.08.003.

Leibrock, J. et al. (1989) 'Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor', Nature, 341(6238), pp. 149–152. doi: 10.1038/341149a0.

Levanon, D. et al. (2002) 'The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 21(13), pp. 3454–63. doi: 10.1093/emboj/cdf370.

Levi-Montalcini, R. (1987) 'The nerve growth factor: thirty-five years later.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 6(5), pp. 1145–54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3301324 (Accessed: 12 July 2017).

Levi-Montalcini, R. and Booker, B. (1960) 'EXCESSIVE GROWTH OF THE SYMPATHETIC GANGLIA EVOKED BY A PROTEIN ISOLATED FROM MOUSE SALIVARY GLANDS.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 46(3), pp. 373–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16578496 (Accessed: 20 June 2018).

Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. (1951) 'Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo.', *The Journal of experimental zoology*, 116(2), pp. 321–61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14824426 (Accessed: 20 June 2018).

Lewin, G. R., Lechner, S. G. and Smith, E. S. J. (2014) 'Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy.', *Handbook of experimental pharmacology*, 220, pp. 251–82. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_10.

Lewin, G. R. and Nykjaer, A. (2014) 'Pro-neurotrophins, sortilin, and nociception.', The European journal of neuroscience, 39(3), pp. 363–74. doi: 10.1111/ejn.12466.

Lewin, G. R., Ritter, A. M. and Mendell, L. M. (1993) 'Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(5), pp. 2136–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478693 (Accessed: 1 August 2017).

Lewin, G. R., Rueff, A. and Mendell, L. M. (1994) 'Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia.', *The European journal of neuroscience*, 6(12), pp. 1903–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7704300 (Accessed: 19 July 2018).

Lindsay, R. M. (1988) 'Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 8(7), pp. 2394–405. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-07-02394.1988.

Ling, S. F. et al. (2016) 'HLA-DRB1 Amino Acid Positions 11/13, 71, and 74 Are Associated With Inflammation Level, Disease Activity, and the Health Assessment Questionnaire Score in Patients With Inflammatory Polyarthritis', Arthritis & Rheumatology, 68(11), pp. 2618–2628. doi: 10.1002/art.39780.

Lingueglia, E. (2007) 'Acid-sensing Ion Channels in Sensory Perception', *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), pp. 17325–17329. doi: 10.1074/jbc.R700011200.

Liu, X. et al. (2013) 'Analysis of Fecal Lactobacillus Community Structure in Patients with Early Rheumatoid Arthritis', *Current Microbiology*, 67(2), pp. 170–176. doi: 10.1007/s00284-013-0338-1.

Longo, G., Osikowicz, M. and Ribeiro-da-Silva, A. (2013) 'Sympathetic Fiber Sprouting in Inflamed Joints and Adjacent Skin Contributes to Pain-Related Behavior in Arthritis', *Journal of Neuroscience*, 33(24), pp. 10066–10074. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5784-12.2013.

van Loosdregt, J. et al. (2016) 'Increased autophagy in CD4 ⁺ T cells of rheumatoid arthritis patients results in T-cell hyperactivation and apoptosis resistance', *European Journal of Immunology*, 46(12), pp. 2862–2870. doi: 10.1002/eji.201646375.

Luberg, K. et al. (2015) 'Novel transcripts reveal a complex structure of the human TRKA gene and imply the presence of multiple protein isoforms', *BMC Neuroscience*, 16(1), p. 78. doi: 10.1186/s12868-015-0215-x.

Lucas, G. et al. (2003) 'Neurotrophin-4 mediated TrkB activation reinforces morphine-induced analgesia.', *Nature neuroscience*, 6(3), pp. 221–2. doi: 10.1038/nn1021.

Luong Ba, K. and Gabay, C. (2014) 'Traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde - Revue Médicale Suisse', *Revue Médicale Suisse*, 10, pp. 595–602. Available at: https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Traitement-de-fond-de-la-polyarthrite-rhumatoide (Accessed: 16 April 2018).

Majuta, L. A. et al. (2015) 'Orthopedic surgery and bone fracture pain are both significantly attenuated by sustained blockade of nerve growth factor', PAIN, 156(1), pp. 157–165. doi: 10.1016/j.pain.0000000000017.

Malik-Hall, M., Dina, O. A. and Levine, J. D. (2005) 'Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGFinduced mechanical hyperalgesia.', *The European journal of neuroscience*, 21(12), pp. 3387–94. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04173.x.

Malmström, V., Catrina, A. I. and Klareskog, L. (2017) 'The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting.', *Nature reviews. Immunology*, 17(1), pp. 60–75. doi: 10.1038/nri.2016.124.

Mamet, J. et al. (2002) 'Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(24), pp. 10662–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486159 (Accessed: 13 August 2018).

Mamet, J., Lazdunski, M. and Voilley, N. (2003) 'How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons.', *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp. 48907–13. doi: 10.1074/jbc.M309468200.

Mantyh, P. W. et al. (2011) 'Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain.', Anesthesiology, 115(1), pp. 189–204. doi: 10.1097/ALN.0b013e31821b1ac5.

Mantyh, P. W. (2014) 'The neurobiology of skeletal pain.', *The European journal of neuroscience*. NIH Public Access, 39(3), pp. 508–19. doi: 10.1111/ejn.12462.

Marra, S. et al. (2016) 'Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids', *The EMBO Journal*, 35(4), pp. 414–428. doi: 10.15252/embj.201592335.

Matcham, F. et al. (2013) 'The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis', *Rheumatology*, 52(12), pp. 2136–2148. doi: 10.1093/rheumatology/ket169.

McCaffrey, G. et al. (2014) 'NGF Blockade at Early Times during Bone Cancer Development Attenuates Bone Destruction and Increases Limb Use', *Cancer Research*, 74(23), pp. 7014–7023. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1220.

McDougall, J. J. (2006) 'Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain.', Arthritis Research & Therapy, 8(6), p. 220. doi: 10.1186/ar2069.

McInnes, I. B. and Schett, G. (2007) 'Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.', *Nature reviews. Immunology*, 7(6), pp. 429–42. doi: 10.1038/nri2094.

McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. and Julius, D. (2002) 'Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.', *Nature*, 416(6876), pp. 52–8. doi: 10.1038/nature719.

McMahon, S. B. and Koltzenburg, M. (1990) 'Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington.', *Trends in neurosciences*, 13(6), pp. 199–201. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694323 (Accessed: 3 May 2018).

McMichael, A. J. et al. (1977) 'Increased Frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in Rheumatoid Arthritis', Arthritis & Rheumatism. John Wiley & Sons, Inc., 20(5), pp. 1037–1042. doi: 10.1002/art.1780200501.

McWilliams, D. F. and Walsh, D. A. (2017a) 'Pain mechanisms in rheumatoid arthritis.', Clinical and experimental

rheumatology, 35 Suppl 1(5), pp. 94–101. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28967354 (Accessed: 3 July 2018).

McWilliams, D. F. and Walsh, D. A. (2017b) 'Pain mechanisms in rheumatoid arthritis.', *Clinical and experimental rheumatology*, 35 Suppl 1(5), pp. 94–101. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28967354 (Accessed: 2 May 2018).

Méchin, M.-C. et al. (2011) 'La désimination ou citrullination', médecine/sciences. Éditions EDK, Groupe EDP Sciences, 27(1), pp. 49–54. doi: 10.1051/medsci/201127149.

Meeker, R. B. and Williams, K. S. (2015) 'The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death.', *Neural regeneration research*. Medknow Publications, 10(5), pp. 721–5. doi: 10.4103/1673-5374.156967.

Meeus, M. et al. (2012) 'Central Sensitization in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review', Seminars in Arthritis and Rheumatism, 41(4), pp. 556–567. doi: 10.1016/j.semarthrit.2011.08.001.

Meis, S. et al. (2018) 'The Relation Between Long-Term Synaptic Plasticity at Glutamatergic Synapses in the Amygdala and Fear Learning in Adult Heterozygous BDNF-Knockout Mice', *Cerebral Cortex*, 28(4), pp. 1195–1208. doi: 10.1093/cercor/bhx032.

Melzack, R. (1990) 'Phantom limbs and the concept of a neuromatrix.', *Trends in neurosciences*, 13(3), pp. 88–92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691874 (Accessed: 10 July 2018).

Melzack, R. (2005) 'Evolution of the neuromatrix theory of pain. The Prithvi Raj Lecture: presented at the third World Congress of World Institute of Pain, Barcelona 2004.', *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 5(2), pp. 85–94. doi: 10.1111/j.1533-2500.2005.05203.x.

Melzack, R. and Wall, P. D. (1965) 'Pain mechanisms: a new theory.', Science (New York, N.Y.), 150(3699), pp. 971–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5320816 (Accessed: 23 May 2018).

Mendell, L. M. and Wall, P. D. (1965) 'Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres.', *Nature*, 206, pp. 97–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14334366 (Accessed: 5 July 2018).

Michaelis, M., Häbler, H. J. and Jäenig, W. (1996) 'Silent afferents: a separate class of primary afferents?', *Clinical and experimental pharmacology* & *physiology*, 23(2), pp. 99–105. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8819636 (Accessed: 3 May 2018).

Mifflin, K. A. and Kerr, B. J. (2017) 'Pain in autoimmune disorders', *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), pp. 1282–1294. doi: 10.1002/jnr.23844.

Mikuls, T. R. et al. (2016) 'Autoimmunity of the lung and oral mucosa in a multisystem inflammatory disease: The spark that lights the fire in rheumatoid arthritis?', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(1), pp. 28–34. doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.024.

Mikuls, T. R. et al. (2017) 'Enrichment of malondialdehyde-acetaldehyde antibody in the rheumatoid arthritis joint', *Rheumatology*, 56(10), pp. 1794–1803. doi: 10.1093/rheumatology/kex212.

Miller, F. D. and Kaplan, D. R. (2001) 'On Trk for retrograde signaling.', *Neuron*, 32(5), pp. 767–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738023 (Accessed: 29 May 2018).

Miller, R. E., Block, J. A. and Malfait, A.-M. (2017) 'Nerve growth factor blockade for the management of osteoarthritis pain: what can we learn from clinical trials and preclinical models?', *Current opinion in rheumatology*. NIH Public Access, 29(1), pp. 110–118. doi: 10.1097/BOR.0000000000354.

Mills, C. D. et al. (2013) 'Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats.', European journal of pain (London, England), 17(4), pp. 469–79. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00202.x.

Minde, J. et al. (2004) 'Familial insensitivity to pain (HSAN V) and a mutation in theNGFB gene. A neurophysiological and pathological study', *Muscle & Nerve*. Wiley-Blackwell, 30(6), pp. 752–760. doi: 10.1002/mus.20172.

Minichiello, E., Semerano, L. and Boissier, M.-C. (2017) 'Incidence, prévalence et sévérité de la polyarthrite rhumatoïde au XXIe siècle', *Revue du Rhumatisme Monographies*. Elsevier Masson, 84(4), pp. 303–310. doi: 10.1016/J.MONRHU.2017.07.002.

Minnone, G., De Benedetti, F. and Bracci-Laudiero, L. (2017) 'NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response.', International journal of molecular sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute

(MDPI), 18(5). doi: 10.3390/ijms18051028.

Miot-Noirault, E. et al. (2007) 'Early detection and monitoring of cartilage alteration in the experimental meniscectomised guinea pig model of osteoarthritis by 99mTc-NTP 15-5 scintigraphy', European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 34(8), pp. 1280–1290. doi: 10.1007/s00259-006-0320-2.

Miot-Noirault, E. et al. (2008) 'First In Vivo SPECT Imaging of Mouse Femorotibial Cartilage Using 99mTc-NTP 15-5.', *Molecular imaging*, 7(6), pp. 263–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19123996 (Accessed: 22 January 2018).

Mizukoshi, K. *et al.* (2013) 'Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after plantar incision.', *Neuroscience*, 234, pp. 77–87. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.001.

Mizumura, K. and Murase, S. (2015) 'Role of Nerve Growth Factor in Pain', in Handbook of experimental pharmacology, pp. 57–77. doi: 10.1007/978-3-662-46450-2_4.

Molendijk, M., Hazes, J. M. and Lubberts, E. (2018) 'From patients with arthralgia, pre-RA and recently diagnosed RA: what is the current status of understanding RA pathogenesis?', *RMD Open*, 4(1), p. e000256. doi: 10.1136/rmdopen-2016-000256.

Moore, C. et al. (2018) 'Regulation of Pain and Itch by TRP Channels', Neuroscience Bulletin, 34(1), pp. 120–142. doi: 10.1007/s12264-017-0200-8.

Moshourab, R. A. *et al.* (2013) 'Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity', *The Journal of Physiology*, 591(22), pp. 5555–5574. doi: 10.1113/jphysiol.2013.261180.

Mu, N. et al. (2016) 'A novel NF-κB/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis', *Scientific Reports*, 6(1), p. 20059. doi: 10.1038/srep20059.

Mullard, A. (2015) 'Drug developers reboot anti-NGF pain programmes.', *Nature reviews. Drug discovery*, 14(5), pp. 297–8. doi: 10.1038/nrd4612.

Murray, E., Malley, S. E., Qiao, L.-Y., Hu, V. Y., & Vizzard, M. A. (2004). Cyclophosphamide induced cystitis alters neurotrophin and receptor tyrosine kinase expression in pelvic ganglia and bladder. *The Journal of Urology*, *172*(6 Pt 1), 2434–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15538286

Musset, L. and Ghillani-Dalbin, P. (2013) 'La polyarthrite rhumatoïde : apport de la biologie au diagnostic et au suivi thérapeutique', *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 28(5–6), pp. 281–286. doi: 10.1016/j.immbio.2013.05.001.

Nagy, I., Lukacs, K. and Urban, L. (2006) 'Mechanisms underlying joint pain', Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. Elsevier, 3(3), pp. 357–363. doi: 10.1016/J.DDMEC.2006.10.002.

Nakano, K. et al. (2013) 'DNA methylome signature in rheumatoid arthritis.', Annals of the rheumatic diseases, 72(1), pp. 110–7. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201526.

Nencini, S. et al. (2017) 'Mechanisms of nerve growth factor signaling in bone nociceptors and in an animal model of inflammatory bone pain', *Molecular Pain*, 13, p. 174480691769701. doi: 10.1177/1744806917697011.

Newkirk, M. M. (2002) 'Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity?', *Clinical immunology (Orlando, Fla.*), 104(1), pp. 1–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139942 (Accessed: 25 January 2018).

Nicol, G. D. and Vasko, M. R. (2007) 'Unraveling the Story of NGF-mediated Sensitization of Nociceptive Sensory Neurons: ON or OFF the Trks?', *Molecular Interventions*, 7(1), pp. 26–41. doi: 10.1124/mi.7.1.6.

Nielen, M. M. J. et al. (2004) 'Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors.', Arthritis and rheumatism, 50(2), pp. 380–6. doi: 10.1002/art.20018.

van Nies, J. A. B. et al. (2015) 'Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: does a window of opportunity exist? Results on the Leiden early arthritis clinic and ESPOIR cohorts.', Annals of the rheumatic diseases, 74(5), pp. 806–12. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206047.

Noël, J. et al. (2009) 'The mechano-activated K+ channels TRAAK and TREK-I control both warm and cold perception', *The EMBO Journal*, 28(9), pp. 1308–1318. doi: 10.1038/emboj.2009.57.

Nykjaer, A. et al. (2004) 'Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death.', Nature, 427(6977), pp.

843-8. doi: 10.1038/nature02319.

Nykjaer, A., Willnow, T. E. and Petersen, C. M. (2005) 'p75NTR--live or let die.', *Current opinion in neurobiology*, 15(1), pp. 49–57. doi: 10.1016/j.conb.2005.01.004.

Obermeier, A. et al. (1993) 'Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex.', *The Journal of biological chemistry*, 268(31), pp. 22963–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226808 (Accessed: 20 July 2018).

Obradovic, A. L. *et al.* (2014) 'CaV3.2 T-type calcium channels in peripheral sensory neurons are important for mibefradil-induced reversal of hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy.', *PloS one*. Edited by J. D. Spafford, 9(4), p. e91467. doi: 10.1371/journal.pone.0091467.

Obreja, O. *et al.* (2017) 'Nerve growth factor locally sensitizes nociceptors in human skin', PAIN, 159(3), p. 1. doi: 10.1097/j.pain.00000000001108.

Okada, Y. *et al.* (2014) 'Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.', *Nature*. NIH Public Access, 506(7488), pp. 376–81. doi: 10.1038/nature12873.

Olive, D. et al. (2011) 'Rôle de CTLA-4 dans la cosignalisation négative du système immunitaire', *médecine/sciences*. Éditions EDK, Groupe EDP Sciences, 27(10), pp. 842–849. doi: 10.1051/medsci/20112710012.

Omerbašić, D. et al. (2015) 'ASICs and mammalian mechanoreceptor function', *Neuropharmacology*, 94, pp. 80–86. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.007.

Omerbašić, D. *et al.* (2016) 'Hypofunctional TrkA Accounts for the Absence of Pain Sensitization in the African Naked Mole-Rat.', *Cell reports*, 17(3), pp. 748–758. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.035.

Otsubo, Y. et al. (2012) 'Mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia is impaired in mice deficient for ERK2 in the central nervous system', *Pain*, 153(11), pp. 2241–2252. doi: 10.1016/j.pain.2012.07.020.

Padyukov, L. *et al.* (2004) 'A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis.', *Arthritis and rheumatism*, 50(10), pp. 3085–92. doi: 10.1002/art.20553.

Palko, M. E., Coppola, V. and Tessarollo, L. (1999) 'Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(2), pp. 775–82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880597 (Accessed: 19 July 2018).

Palladino, M. A. et al. (2003) 'Anti-TNF-α therapies: the next generation', Nature Reviews Drug Discovery, 2(9), pp. 736–746. doi: 10.1038/nrd1175.

Pang, M. et al. (2007) 'AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells.', Gene, 403(1–2), pp. 151–8. doi: 10.1016/j.gene.2007.08.007.

Pap, T. and Korb-Pap, A. (2015) 'Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis--two unequal siblings.', *Nature reviews. Rheumatology*, 11(10), pp. 606–15. doi: 10.1038/nrrheum.2015.95.

Park, H. and Poo, M. (2013) 'Neurotrophin regulation of neural circuit development and function', *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), pp. 7–23. doi: 10.1038/nrn3379.

Park, M. et al. (2015) 'Evaluation of a specific diagnostic marker for rheumatoid arthritis based on cyclic citrullinated peptide.', *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 115, pp. 107–13. doi: 10.1016/j.jpba.2015.06.032.

Park, T. J. et al. (2008) 'Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (Heterocephalus glaber).', *PLoS biology*. Edited by A. I. Basbaum, 6(1), p. e13. doi: 10.1371/journal.pbio.0060013.

Pasutto, F. et al. (2009) 'Heterozygous NTF4 Mutations Impairing Neurotrophin-4 Signaling in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma', *The American Journal of Human Genetics*, 85(4), pp. 447–456. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.08.016.

Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. (2001) 'Trk receptors: mediators of neurotrophin action', *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), pp. 272–280.

Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., & Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(7), 529–39. https://doi.org/10.1038/nrn1141

Patel, T. D. et al. (2000) 'Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo.', *Neuron*, 25(2), pp. 345–57. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719890 (Accessed: 22 July 2018).

Paycha, F. and Richard, B. (2001) *Exploration scintigraphique du squelette*. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Available at: http://www.em-consulte.com/article/21829/exploration-scintigraphique-du-squelette (Accessed: 22 January 2018).

Peigneur, S. et al. (2012) 'A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins.', FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 26(12), pp. 5141–51. doi: 10.1096/fj.12-218479.

Perrot, S. *et al.* (2013) 'Comparison of pain, pain burden, coping strategies, and attitudes between patients with systemic sclerosis and patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study.', *Pain medicine (Malden, Mass.)*, 14(11), pp. 1776–85. doi: 10.1111/pme.12213.

Petrus, M. et al. (2007) 'A Role of TRPA1 in Mechanical Hyperalgesia is Revealed by Pharmacological Inhibition', *Molecular Pain*, 3, pp. 1744-8069-3–40. doi: 10.1186/1744-8069-3-40.

Petty, B. G. et al. (1994) 'The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects.', Annals of neurology, 36(2), pp. 244–6. doi: 10.1002/ana.410360221.

Pezet, S. et al. (2002) 'BDNF modulates sensory neuron synaptic activity by a facilitation of GABA transmission in the dorsal horn.', *Molecular and cellular neurosciences*, 21(1), pp. 51–62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359151 (Accessed: 15 August 2018).

Pezet, S. et al. (2014) 'Neurotrophines et douleur', Biologie Aujourd'hui. EDP Sciences, 208(1), pp. 21–29. doi: 10.1051/jbio/2014002.

Pezet, S. and McMahon, S. B. (2006) 'NEUROTROPHINS: Mediators and Modulators of Pain', Annual Review of Neuroscience, 29(1), pp. 507–538. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929.

Pfeifle, R. et al. (2017) 'Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease.', Nature immunology, 18(1), pp. 104–113. doi: 10.1038/ni.3579.

Piñero, J. et al. (2015) 'DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes.', *Database : the journal of biological databases and curation*. Oxford University Press, 2015, p. bav028. doi: 10.1093/database/bav028.

Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A. and Chiu, I. M. (2017) 'Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation.', *Trends in immunology*, 38(1), pp. 5–19. doi: 10.1016/j.it.2016.10.001.

Potempa, J., Mydel, P. and Koziel, J. (2017) 'The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 13(10), pp. 606–620. doi: 10.1038/nrrheum.2017.132.

Pramanik, S., Sulistio, Y. A. and Heese, K. (2017) 'Neurotrophin Signaling and Stem Cells-Implications for Neurodegenerative Diseases and Stem Cell Therapy.', *Molecular neurobiology*, 54(9), pp. 7401–7459. doi: 10.1007/s12035-016-0214-7.

Prato, V. et al. (2017) 'Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive "Silent" Nociceptors.', Cell reports, 21(11), pp. 3102–3115. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.066.

Prencipe, G. et al. (2014) 'Nerve Growth Factor Downregulates Inflammatory Response in Human Monocytes through TrkA', *The Journal of Immunology*, 192(7), pp. 3345–3354. doi: 10.4049/jimmunol.1300825.

del Puente, A. et al. (1988) 'The incidence of rheumatoid arthritis is predicted by rheumatoid factor titer in a longitudinal population study.', Arthritis and rheumatism, 31(10), pp. 1239–44. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3178905 (Accessed: 19 April 2018).

Puszczewicz, M. and Iwaszkiewicz, C. (2011) 'Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis.', *Archives of medical science* : AMS. Termedia Publishing, 7(2), pp. 189–94. doi: 10.5114/aoms.2011.22067.

Radeke, M. J. et al. (1987) 'Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor', *Nature*, 325(6105), pp. 593–597. doi: 10.1038/325593a0.

Radner, H. and Aletaha, D. (2015) 'Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview', Wiener Medizinische Wochenschrift, 165(1–2), pp. 3–9. doi: 10.1007/s10354-015-0344-y.

Rannou, F. et al. (2006) 'Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis', Joint Bone Spine, 73(1), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.jbspin.2004.12.013.

Rantapää-Dahlqvist, S. et al. (2003) 'Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis', *Arthritis & Rheumatism*, 48(10), pp. 2741–2749. doi: 10.1002/art.11223.

Rauskolb, S. et al. (2010) 'Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an areaspecific requirement for dendritic growth.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(5), pp. 1739–49. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5100-09.2010.

Raychaudhuri, S. et al. (2012) 'Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis.', *Nature genetics*. NIH Public Access, 44(3), pp. 291–6. doi: 10.1038/ng.1076.

Raychaudhuri, S. P. et al. (2011) 'Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis', Arthritis & Rheumatism, 63(11), pp. 3243–3252. doi: 10.1002/art.30564.

Raza, K. (2010) 'The Michael Mason prize: early rheumatoid arthritis--the window narrows', *Rheumatology*. Oxford University Press, 49(3), pp. 406–410. doi: 10.1093/rheumatology/kep392.

Raza, K. and Filer, A. (2015) 'The therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis: does it ever close?', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(5), pp. 793–794. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206993.

Reichardt, L. F. (2006) 'Neurotrophin-regulated signalling pathways', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1473), pp. 1545–1564. doi: 10.1098/rstb.2006.1894.

Richez, C. et al. (2017) 'La polyarthrite rhumatoïde : une physiopathologie mieux connue ?', Revue du Rhumatisme Monographies. Elsevier Masson, 84(4), pp. 311–317. doi: 10.1016/J.MONRHU.2017.07.006.

Risch, N., Pointeau, F. and Poquet, N. (2017) 'Nociception', *Kinésithérapie, la Revue*, 17(186), pp. 5–15. doi: 10.1016/j.kine.2017.02.130.

Ritter, A. M. et al. (1991) 'Requirement for nerve growth factor in the development of myelinated nociceptors in vivo.', *Nature*, 350(6318), pp. 500–2. doi: 10.1038/350500a0.

Roberti, G. et al. (2014) 'Nerve Growth Factor Modulation of Retinal Ganglion Cell Physiology', Journal of Cellular Physiology, 229(9), pp. 1130–1133. doi: 10.1002/jcp.24573.

Roche, P. A., Klestov, A. C. and Heim, H. M. (2003) 'Description of stable pain in rheumatoid arthritis: a 6 year study.', *The Journal of rheumatology*, 30(8), pp. 1733–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913928 (Accessed: 27 August 2018).

Rombouts, Y. et al. (2015) 'Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis.', Annals of the rheumatic diseases, 74(1), pp. 234–41. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203565.

Rosenthal, A. et al. (1990) 'Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor.', *Neuron*, 4(5), pp. 767–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2344409 (Accessed: 19 July 2018).

Rossi, D. et al. (2015) 'Rheumatoid arthritis: Biological therapy other than anti-TNF', International Immunopharmacology, 27(2), pp. 185–188. doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.019.

Roux, P. P. and Barker, P. A. (2002) 'Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor.', *Progress in neurobiology*, 67(3), pp. 203–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169297 (Accessed: 22 July 2018).

Rozakis-Adcock, M. et al. (1992) 'Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases', *Nature*, 360(6405), pp. 689–692. doi: 10.1038/360689a0.

Rudan, I. et al. (2015) 'Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis.', *Journal of global health*. Edinburgh University Global Health Society, 5(1), p. 010409. doi: 10.7189/jogh.05.010409.

Ruit, K. G. et al. (1990) 'Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse.', The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 10(7), pp. 2412–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2376779 (Accessed: 2 August 2018).

Ruit, K. G. et al. (1992) 'Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth

factor during embryonic development.', *Neuron*, 8(3), pp. 573–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1550679 (Accessed: 2 August 2018).

Rukwied, R., Schley, M., et al. (2010) 'Nerve growth factor-evoked nociceptor sensitization in pig skin in vivo.', *Journal of neuroscience research*, 88(9), pp. 2066–72. doi: 10.1002/jnr.22351.

Rukwied, R., Mayer, A., et al. (2010) 'NGF induces non-inflammatory localized and lasting mechanical and thermal hypersensitivity in human skin', Pain, 148(3), pp. 407–413. doi: 10.1016/j.pain.2009.11.022.

Sabokbar, A. et al. (2016) 'Non-Canonical (RANKL-Independent) Pathways of Osteoclast Differentiation and Their Role in Musculoskeletal Diseases.', *Clinical reviews in allergy & immunology*, 51(1), pp. 16–26. doi: 10.1007/s12016-015-8523-6.

Sarzi-Puttini, P. et al. (2014) 'Pain in rheumatoid arthritis: a critical review.', *Reumatismo*, 66(1), pp. 18–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24938192 (Accessed: 27 April 2018).

Saxne, T. et al. (1988) 'Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum.', Arthritis and rheumatism, 31(8), pp. 1041–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136775 (Accessed: 16 April 2018).

von Schack, D. et al. (2001) 'Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system', *Nature Neuroscience*, 4(10), pp. 977–978. doi: 10.1038/nn730.

Schaible, H.-G. (2013) 'Articular Nociceptors', in *Encyclopedia of Pain*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 207–213. doi: 10.1007/978-3-642-28753-4_289.

Schaible, H. G. and Grubb, B. D. (1993) 'Afferent and spinal mechanisms of joint pain.', *Pain*, 55(1), pp. 5–54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8278210 (Accessed: 30 May 2018).

Schaible, H. G. and Schmidt, R. F. (1983) 'Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by local mechanical stimulation of knee joint.', *Journal of Neurophysiology*, 49(1), pp. 35–44. doi: 10.1152/jn.1983.49.1.35.

Schaible, H. G. and Schmidt, R. F. (1985) 'Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units', *Journal of Neurophysiology*, 54(5), pp. 1109–1122. doi: 10.1152/jn.1985.54.5.1109.

Scher, J. U. (2012) 'B-cell therapies for rheumatoid arthritis.', *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*, 70(3), pp. 200–3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259629 (Accessed: 25 April 2018).

Scher, J. U. et al. (2013) 'Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis.', eLife. eLife Sciences Publications, Ltd, 2, p. e01202. doi: 10.7554/eLife.01202.

Scherer, H. U. et al. (2010) 'Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid.', Arthritis and rheumatism, 62(6), pp. 1620–9. doi: 10.1002/art.27414.

Schrepf, A. et al. (2018) 'A multi-modal MRI study of the central response to inflammation in rheumatoid arthritis.', *Nature communications*, 9(1), p. 2243. doi: 10.1038/s41467-018-04648-0.

Schwartz, D. M. et al. (2017) 'JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases', Nature Reviews Drug Discovery, 17(1), pp. 78–78. doi: 10.1038/nrd.2017.267.

Segal, R. A. and Greenberg, M. E. (1996) 'Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors.', *Annual review of neuroscience*, 19(1), pp. 463–89. doi: 10.1146/annurev.ne.19.030196.002335.

Seror, R. et al. (2017) 'OP0253 Passive smoking in childhood and history of chronic diarrhea increases the risk of developing rheumatoid arthritis (RA)', in *Oral Presentations*. BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism, p. 160.2-161. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3853.

Shelton, D. L. *et al.* (2005) 'Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis.', *Pain*, 116(1–2), pp. 8–16. doi: 10.1016/j.pain.2005.03.039.

Shen, T. et al. (2018) 'BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders', Aging and Disease, 9(3), p. 523. doi: 10.14336/AD.2017.0717.

Sherrington, C. S. (1906) The Integrative Action of the Nervous System. Available at: https://books.google.fr/books?hl=fr&Ir=&id=CRU8AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Sherrington,+C.S.+(1906) .+The+Integrative+Action+of+the+Nervous+System&ots=KASwpqdo42&sig=90Q8pYHcflUhYR -

T05pQusu59w#v=onepage&q=Sherrington%252C%2520C.S.%2520(1906).%2520The%2520Integrative%25 (Accessed: 1 May 2018).

Shi, J. et al. (2011) 'Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage.', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(42), pp. 17372–7. doi: 10.1073/pnas.1114465108.

Shi, J. et al. (2013) 'Anti-Carbamylated Protein Antibodies Are Present in Arthralgia Patients and Predict the Development of Rheumatoid Arthritis', Arthritis & Rheumatism, 65(4), pp. 911–915. doi: 10.1002/art.37830.

Shi, J. et al. (2014) 'Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies.', Autoimmunity reviews, 13(3), pp. 225–30. doi: 10.1016/j.autrev.2013.10.008.

Shi, J. et al. (2015) 'The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis.', Arthritis research & therapy. BioMed Central, 17, p. 339. doi: 10.1186/s13075-015-0860-6.

Shu, X. and Mendell, L. M. (1999) 'Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin.', *Neuroscience letters*, 274(3), pp. 159–62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548414 (Accessed: 2 August 2018).

Shu, X. and Mendell, L. M. (2001) 'Acute Sensitization by NGF of the Response of Small-Diameter Sensory Neurons to Capsaicin', *Journal of Neurophysiology*. American Physiological SocietyBethesda, MD , 86(6), pp. 2931–2938. doi: 10.1152/jn.2001.86.6.2931.

Sikandar, S. et al. (2018) 'Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain', Brain, 141(4), pp. 1028–1039. doi: 10.1093/brain/awy009.

Sipilä, K. H. et al. (2017) 'Joint inflammation related citrullination of functional arginines in extracellular proteins.', *Scientific reports*, 7(1), p. 8246. doi: 10.1038/s41598-017-08597-4.

Skaper, S. D. (2012) 'The Neurotrophin Family of Neurotrophic Factors: An Overview', in, pp. 1–12. doi: 10.1007/978-1-61779-536-7_1.

Sluka, K. A. *et al.* (2007) 'ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation.', *Pain.* NIH Public Access, 129(1–2), pp. 102–12. doi: 10.1016/j.pain.2006.09.038.

Sluka, K. A. et al. (2013) 'Acid-Sensing Ion Channel 3 Deficiency Increases Inflammation but Decreases Pain Behavior in Murine Arthritis', Arthritis & Rheumatism, 65(5), pp. 1194–1202. doi: 10.1002/art.37862.

Smedegård, G. and Björk, J. (1995) 'Sulphasalazine: mechanism of action in rheumatoid arthritis.', *British journal of rheumatology*, 34 Suppl 2, pp. 7–15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8535652 (Accessed: 16 April 2018).

Smeyne, R. J. et al. (1994) 'Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene', *Nature*, 368(6468), pp. 246–249. doi: 10.1038/368246a0.

Smolen, J. S. *et al.* (2014) 'EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(3), pp. 492–509. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204573.

Smolen, J. S. *et al.* (2017) 'EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update.', *Annals of the rheumatic diseases*, 76(6), pp. 960–977. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715.

Smolen, J. S. et al. (2018) 'Rheumatoid arthritis', Nature Reviews Disease Primers, 4, p. 18001. doi: 10.1038/nrdp.2018.1.

Smolen, J. S., Aletaha, D. and McInnes, I. B. (2016) 'Rheumatoid arthritis', *The Lancet*, 388(10055), pp. 2023–2038. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.

Sohn, D. H. *et al.* (2015) 'Local Joint Inflammation and Histone Citrullination in a Murine Model of the Transition From Preclinical Autoimmunity to Inflammatory Arthritis', *Arthritis & Rheumatology*, 67(11), pp. 2877–2887. doi: 10.1002/art.39283.

Sokolove, J. and Pisetsky, D. (2016) 'Bone loss, pain and inflammation: three faces of ACPA in RA pathogenesis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(4), pp. 637–639. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208308.

Soliman, F. et al. (2010) 'A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human.', Science (New York, N.Y.), 327(5967), pp. 863–6. doi: 10.1126/science.1181886.

Sopata, M. et al. (2015) 'Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of pain from bone metastases.', Pain, 156(9), pp. 1703–13. doi: 10.1097/j.pain.00000000000211.

Sprenger, C. et al. (2015) 'Douleur contre douleur: le principe des contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive', Douleur et Analgésie. Lavoisier, 28(4), pp. 206–211. doi: 10.1007/s11724-015-0406-3.

van de Stadt, L. A. et al. (2013) 'A prediction rule for the development of arthritis in seropositive arthralgia patients.', Annals of the rheumatic diseases, 72(12), pp. 1920–6. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202127.

Stastny, P. (1978) 'Association of the B-Cell Alloantigen DRw4 with Rheumatoid Arthritis', New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society , 298(16), pp. 869–871. doi: 10.1056/NEJM197804202981602.

van Steenbergen, H. W. et al. (2017) 'Preventing progression from arthralgia to arthritis: targeting the right patients', *Nature Reviews Rheumatology*, 14(1), pp. 32–41. doi: 10.1038/nrrheum.2017.185.

Stein, A. T. *et al.* (2006) 'Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPVI and mediates NGF-stimulated TRPVI trafficking to the plasma membrane.', *The Journal of general physiology*. The Rockefeller University Press, 128(5), pp. 509–22. doi: 10.1085/jgp.200609576.

Stolt, P. et al. (2003) 'Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases.', Annals of the rheumatic diseases, 62(9), pp. 835–41. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922955 (Accessed: 27 February 2018).

Sturgeon, J. A., Finan, P. H. and Zautra, A. J. (2016) 'Affective disturbance in rheumatoid arthritis: psychological and disease-related pathways.', *Nature reviews. Rheumatology*, 12(9), pp. 532–42. doi: 10.1038/nrrheum.2016.112.

Sugimura, N. et al. (2015) 'Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia', European Journal of Pain, 19(5), pp. 629–638. doi: 10.1002/ejp.584.

Sun, R.-Q., Lawand, N. B. and Willis, W. D. (2003) 'The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the generation and maintenance of mechanical allodynia and hyperalgesia in rats after intradermal injection of capsaicin.', *Pain*, 104(1–2), pp. 201–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855330 (Accessed: 17 August 2018).

Sun, W. H. and Chen, C. C. (2016) 'Roles of Proton-Sensing Receptors in the Transition from Acute to Chronic Pain', *Journal of Dental Research*, 95(2), pp. 135–142. doi: 10.1177/0022034515618382.

Sung, K. et al. (2018) 'Swedish Nerve Growth Factor Mutation (NGF ^{R100W}) Defines a Role for TrkA and p75 ^{NTR} in Nociception', *The Journal of Neuroscience*, 38(14), pp. 3394–3413. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1686-17.2018.

Sur Chowdhury, C. et al. (2014) 'Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility', Arthritis Research & Therapy, 16(3), p. R122. doi: 10.1186/ar4579.

Svensson, P. et al. (2003) 'Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia.', *Pain*, 104(1–2), pp. 241–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855334 (Accessed: 28 May 2018).

Talbot, S., Foster, S. L. and Woolf, C. J. (2016) 'Neuroimmunity: Physiology and Pathology.', Annual review of immunology, 34(1), pp. 421–47. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055340.

Taylor, P. et al. (2010) 'Patient Perceptions concerning Pain Management in the Treatment of Rheumatoid Arthritis', *Journal of International Medical Research*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 38(4), pp. 1213–1224. doi: 10.1177/147323001003800402.

Thiele, G. M. et al. (2015) 'Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts and Anti-Malondialdehyde-Acetaldehyde Antibodies in Rheumatoid Arthritis', *Arthritis & Rheumatology*, 67(3), pp. 645–655. doi: 10.1002/art.38969.

Tian, H. and Cronstein, B. N. (2007) 'Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis.', *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*, 65(3), pp. 168–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922664 (Accessed: 25 January 2018).

Tomlinson, R. E. et al. (2016) 'NGF-TrkA signaling by sensory nerves coordinates the vascularization and ossification of developing endochondral bone HHS Public Access Graphical Abstract', September, 6(1610), pp. 2723–2735. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.002.

Tomlinson, R. E. et al. (2017) 'NGF-TrkA signaling in sensory nerves is required for skeletal adaptation to mechanical loads in mice.', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(18), pp. E3632–E3641. doi: 10.1073/pnas.1701054114.

Toni, T., Dua, P. and van der Graaf, P. H. (2014) 'Systems Pharmacology of the NGF Signaling Through p75 and TrkA Receptors', *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.*, 3(12), p. e150. doi: 10.1038/psp.2014.48.

Tracey, W. D. (2017) 'Nociception', Current Biology, 27(4), pp. R129-R133. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.037.

Tracy, A., Buckley, C. D. and Raza, K. (2017) 'Pre-symptomatic autoimmunity in rheumatoid arthritis: when does the disease start?', *Seminars in immunopathology*. Springer, 39(4), pp. 423–435. doi: 10.1007/s00281-017-0620-6.

Trouw, L. A., Huizinga, T. W. J. and Toes, R. E. M. (2013) 'Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles.', *Annals of the rheumatic diseases*, 72 Suppl 2(suppl 2), pp. ii132-6. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202349.

Ugolini, G. et al. (2007) 'The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain.', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(8), pp. 2985–90. doi: 10.1073/pnas.0611253104.

Vaahtovuo, J. et al. (2008) 'Fecal Microbiota in Early Rheumatoid Arthritis', *The Journal of Rheumatology*, 35(8). Available at: http://www.jrheum.org/content/35/8/1500.long (Accessed: 19 January 2018).

Vaghef-Mehrabany, E. et al. (2014) 'Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis.', *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(4), pp. 430–5. doi: 10.1016/j.nut.2013.09.007.

Vandewauw, I. et al. (2018) 'A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing', *Nature*, 555(7698), pp. 662–666. doi: 10.1038/nature26137.

Varon, S., Nomura, J. and Shooter, E. M. (1967) 'Subunit structure of a high-molecular-weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 57(6), pp. 1782–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5231412 (Accessed: 21 July 2018).

van Baarsen, L. G. M., de Hair, M. J. H., Ramwadhdoebe, T. H., Zijlstra, I. J. A. J., Maas, M., Gerlag, D. M., & Tak, P. P. (2013). The cellular composition of lymph nodes in the earliest phase of inflammatory arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(8), 1420–4. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202990

van de Stadt, L. A., de Koning, M. H. M. T., van de Stadt, R. J., Wolbink, G., Dijkmans, B. A. C., Hamann, D., & van Schaardenburg, D. (2011). Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 63(11), 3226–3233. https://doi.org/10.1002/art.30537

van Venrooij, W. J. and Pruijn, G. J. M. (2014) 'How citrullination invaded rheumatoid arthritis research.', Arthritis research & therapy, 16(1), p. 103. doi: 10.1186/ar4458.

Viatte, S. and Barton, A. (2017) 'Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response.', Seminars in immunopathology. Springer, 39(4), pp. 395–408. doi: 10.1007/s00281-017-0630-4.

Vilar, M. (2017) 'Structural Characterization of the p75 Neurotrophin Receptor', in *Vitamins and hormones*, pp. 57–87. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.007.

van Vollenhoven, R. F. *et al.* (2012) 'Tofacitinib or Adalimumab versus Placebo in Rheumatoid Arthritis', New *England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 367(6), pp. 508–519. doi: 10.1056/NEJMoa1112072.

Waldmann, R. et al. (1997) 'A proton-gated cation channel involved in acid-sensing', Nature, 386(6621), pp. 173–177. doi: 10.1038/386173a0.

Walsh, D. A. and McWilliams, D. F. (2014) 'Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 10(10), pp. 581–592. doi: 10.1038/nrrheum.2014.64.

Walsh, N. C. and Gravallese, E. M. (2010) 'Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance', *Immunological Reviews*, 233(1), pp. 301–312. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00857.x.

Wang, L. et al. (2006) 'Locally applied nerve growth factor enhances bone consolidation in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis.', *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 24(12), pp. 2238–45. doi: 10.1002/jor.20269.

Wang, Y.-R. *et al.* (2017) 'Ligustilide relieves complete Freund's adjuvant-induced mechanical hyperalgesia through inhibiting the activation of spinal c-Jun N-terminal kinase/c-jun pathway in rats', *Pharmacognosy Magazine*, 13(52), p. 634. doi: 10.4103/pm.pm_546_16.

Watanabe, M. et al. (2000) 'Inhibition of adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in rats by local injection of neurotrophin-3.', *Neuroscience letters*, 282(1–2), pp. 61–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713396 (Accessed: 11 August 2018).

Watson, F. L. et al. (2001) 'Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response.', *Nature neuroscience*, 4(10), pp. 981–8. doi: 10.1038/nn720.

Wegner, N. et al. (2010) 'Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis', Arthritis & Rheumatism, 62(9), pp. 2662–2672. doi: 10.1002/art.27552.

Weinblatt, M. E. et al. (1985) 'Efficacy of Low-Dose Methotrexate in Rheumatoid Arthritis', New England Journal of Medicine, 312(13), pp. 818–822. doi: 10.1056/NEJM198503283121303.

Wendling, D. (2016) '"Treat to target" en rhumatologie', *La Lettre du Rhumatologue n°425*. Available at: https://www.google.fr/search?client=firefoxb&dcr=0&ei=NctuWp_2DcSDsAfnn5_oCA&q=stratégie+thérapeutique+treat+to+target&oq=stratégie+thér apeutique+treat+to+target&gs_l=psy-ab.3...11434.14725.0.14968.19.19.0.0.0.0.180.2056.8j11.19.0.... (Accessed: 29 January 2018).

West, A. E., Pruunsild, P. and Timmusk, T. (2014) 'Neurotrophins: Transcription and Translation', in *Handbook* of experimental pharmacology, pp. 67–100. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5 4.

Westlund, K. N. (2006) 'Chapter 9 The dorsal horn and hyperalgesia.', *Handbook of clinical neurology*. NIH Public Access, 81, pp. 103–25. doi: 10.1016/S0072-9752(06)80013-8.

Wetzel, C. et al. (2017) 'Small-molecule inhibition of STOML3 oligomerization reverses pathological mechanical hypersensitivity', *Nature Neuroscience*, 20(2), pp. 209–218. doi: 10.1038/nn.4454.

Weyand, C. M. and Goronzy, J. J. (2017) 'Immunometabolism in early and late stages of rheumatoid arthritis.', *Nature reviews. Rheumatology*, 13(5), pp. 291–301. doi: 10.1038/nrrheum.2017.49.

White, D. M. (1998) 'Contribution of neurotrophin-3 to the neuropeptide Y-induced increase in neurite outgrowth of rat dorsal root ganglion cells.', *Neuroscience*, 86(1), pp. 257–63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692759 (Accessed: 11 August 2018).

WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium (2003) 'The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium.', *World Health Organization technical report series*, 919, p. i–x, 1-218, back cover. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679827 (Accessed: 15 January 2018).

Wigerblad, G. et al. (2016) 'Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism.', Annals of the rheumatic diseases, 75(4), pp. 730–8. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208094.

Wilson-Gerwing, T. D. et al. (2005) 'Neurotrophin-3 Suppresses Thermal Hyperalgesia Associated with Neuropathic Pain and Attenuates Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor-I Expression in Adult Sensory Neurons', *Journal of Neuroscience*, 25(3), pp. 758–767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3909-04.2005.

Wilson-Gerwing, T. D. et al. (2008) 'Neurotrophin-3 significantly reduces sodium channel expression linked to neuropathic pain states.', *Experimental neurology*. NIH Public Access, 213(2), pp. 303–14. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.06.002.

Woolf, C. J. (1983) 'Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity.', *Nature*, 306(5944), pp. 686–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6656869 (Accessed: 9 July 2018).

Woolf, C. J. et al. (1994) 'Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity.', *Neuroscience*, 62(2), pp. 327–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530342 (Accessed: 31 August 2018).

Woolf, C. and Ma, Q. (2007) 'Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors', *Neuron*. Cell Press, 55(3), pp. 353-364. doi: 10.1016/J.NEURON.2007.07.016.

Wu, Z., Nagata, K. and lijima, T. (2000) 'Immunohistochemical study of NGF and its receptors in the synovial membrane of the ankle joint of adjuvant-induced arthritic rats.', *Histochemistry and cell biology*, 114(6), pp. 453–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201606 (Accessed: 19 August 2018).

Van den Wyngaert, T. et al. (2016) 'The EANM practice guidelines for bone scintigraphy', European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Springer Berlin Heidelberg, 43(9), pp. 1723–1738. doi: 10.1007/s00259-016-3415-4.

Xu, L. et al. (2016) 'The anti-NGF antibody muMab 911 both prevents and reverses pain behaviour and

subchondral osteoclast numbers in a rat model of osteoarthritis pain', Osteoarthritis and Cartilage, 24(9), pp. 1587–1595. doi: 10.1016/j.joca.2016.05.015.

Yajima, Y. et al. (2002) 'Involvement of a spinal brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB pathway in the development of nerve injury-induced thermal hyperalgesia in mice.', *Brain research*, 958(2), pp. 338–46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470870 (Accessed: 25 July 2018).

Yasui, M. et al. (2012) 'Nerve growth factor and associated nerve sprouting contribute to local mechanical hyperalgesia in a rat model of bone injury.', *European journal of pain (London, England)*, 16(7), pp. 953–65. doi: 10.1002/j.1532-2149.2011.00094.x.

Yoshimura, N. et al. (2003) 'Histological and electrical properties of rat dorsal root ganglion neurons innervating the lower urinary tract.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(10), pp. 4355–61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764124 (Accessed: 17 September 2018).

Ytterberg, A. J. et al. (2015) 'Shared immunological targets in the lungs and joints of patients with rheumatoid arthritis: identification and validation.', *Annals of the rheumatic diseases*, 74(9), pp. 1772–7. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204912.

Yu, G.-M. et al. (2018) 'Dual role of acid-sensing ion channels 3 in rheumatoid arthritis: destruction or protection?', *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, pp. 1–5. doi: 10.1080/08923973.2018.1485156.

van Zanten, A. *et al.* (2017) 'Presence of anticitrullinated protein antibodies in a large population-based cohort from the Netherlands.', *Annals of the rheumatic diseases*, 76(7), pp. 1184–1190. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209991.

Zhang, J.-M. and An, J. (2007) 'Cytokines, inflammation, and pain.', *International anesthesiology clinics*. NIH Public Access, 45(2), pp. 27–37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

Zhang, X. et al. (2015) 'The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment', *Nature Medicine*, 21(8), pp. 895–905. doi: 10.1038/nm.3914.

Zhao, J. et al. (2006) 'Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain.', *Molecular and cellular neurosciences*, 31(3), pp. 539–48. doi: 10.1016/j.mcn.2005.11.008.

Zhao, X. et al. (2008) 'Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis.', Arthritis research & therapy. BioMed Central, 10(4), p. R94. doi: 10.1186/ar2478.

Zhou, X. F. *et al.* (2000) 'Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats.', *The European journal of neuroscience*, 12(1), pp. 100–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651864 (Accessed: 2 October 2018).

Zink, A. and Albrecht, K. (2017) 'Rheumatoid arthritis: The benefits of early treatment after decades.', *Nature reviews. Rheumatology*, 13(8), pp. 458–459. doi: 10.1038/nrrheum.2017.104.

Zufferey, P. and Becce, F. (2014) Rôle de l'imagerie dans le diagnostic et le suivi de la polyarthrite rhumatoïde, Revue Médicale Suisse. Available at: https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-421/Role-de-l-imagerie-dans-le-diagnostic-et-le-suivi-de-la-polyarthrite-rhumatoide (Accessed: 22 January 2018).

Zweifel, L. S., Kuruvilla, R. and Ginty, D. D. (2005) 'Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling', *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), pp. 615–625. doi: 10.1038/nrn1727.

La douleur chronique articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde : rôle des canaux ASIC3 dans l'arthralgie induite par les ACPA et des voies de signalisation NGF/TrkA dans la douleur chronique inflammatoire

La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie auto-immune qui affecte près de 1% de la population mondiale et se caractérise par une inflammation articulaire, des altérations cartilagineuses et osseuses notamment associées à des douleurs chroniques articulaires, souvent résistantes aux thérapeutiques actuelles. Que ce soit à un stade préclinique, où l'on parle d'arthralgie, ou à un stade établi de la pathologie, ces douleurs constituent un réel handicap pour les patients atteints avec plus de 60% d'entre eux insatisfaits de sa prise en charge. La présence d'une synovite étant nécessaire au diagnostic de la PR, aucune stratégie thérapeutique n'est mise en place à un stade préclinique. En outre, à un stade établi, la stratégie actuelle vise en premier lieu à diminuer l'activité de la pathologie sans prise en charge de la douleur en tant que telle.

Parmi les acteurs de la synovite dans la PR, un rôle essentiel est attribué au facteur de croissance des nerfs ou Nerve Growth Factor dans la mise en place et le maintien des symptômes douloureux. Les anti-NGF sont connus comme des molécules antalgiques prometteuses. Néanmoins, de par son action pléiotropique, cibler cette neurotrophine conduit à des effets indésirables potentiellement importants. Dans la première partie de ce travail, nous avons cherché à mieux caractériser l'implication spécifique des voies de signalisation intracellulaires au récepteur tyrosine kinase de type A (TrkA) de haute affinité au NGF, dans un contexte de douleur articulaire inflammatoire (arthrite) mais aussi de douleurs somatique et viscérale. Un modèle de knock-out total pour le récepteur TrkA n'étant pas viable, nous avons réalisé une étude multimodale chez des souris knock-in TrkA/C, exprimant un récepteur chimérique composé de la partie extracellulaire native du récepteur TrkA et des parties transmembranaire et intracellulaire fonctionnelles du récepteur à la neurotrophine 3 : le récepteur TrkC. Ce dernier n'étant que peu ou pas impliqué dans la douleur inflammatoire. Ainsi, le NGF pourra se lier normalement au récepteur TrkA/C mais activera les voies de signalisation intracellulaires du récepteur TrkC. Les résultats de nos études ont mis en évidence qu'une absence d'activation de certaines voies en aval de TrkA (i.e. c-Jun et p38 MAPK) au niveau des DRGs chez les souris TrkA/C, impacte significativement la mise en place des symptômes douloureux, en particulier l'hypersensibilité mécanique, que ce soit dans un contexte de douleur articulaire, somatique ou viscérale, sans affecter l'hyperalgie thermique au chaud. Ces résultats résultent d'une part de la diminution de la néo-innervation CGRP⁺ mais aussi de changements transcriptionnels de certains neurotransmetteurs et mécanotransducteurs dont le canal ionique sensible aux protons : ASIC3. De plus, un lien entre NGF/TrkA et le remodelage osseux, en particulier, l'activation ostéoclastique, a été démontré mettant en avant un rôle doublement bénéfique de l'inhibition de certaines voies associées à TrkA, à la fois dans certains symptômes douloureux et l'érosion osseuse retrouvée dans la PR.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans l'arthralgie induite par l'injection d'autoanticorps anti-peptides citrullinées (ACPA). La majorité des patients PR sont positifs pour les ACPA qui peuvent être produits des mois voire des années, avant son diagnostic et semblent être directement associés au développement des symptômes douloureux. Cette arthralgie constitue l'un des premiers signes d'une PR émergente et peu persister, même suite à la prise en charge thérapeutique des patients PR. Tout d'abord, nous avons confirmé que les sous-types monoclonaux IgG1 ACPA diffèrent par leurs propriétés pronociceptives et érosives de l'os, certainement liées à leurs différentes réactivités vis-à-vis des épitopes citrullinés. Ainsi, la combinaison des clones B02/B09 d'ACPA induits, chez les souris injectées, le développement de symptômes douloureux sans inflammation, mais associés à une altération de l'homéostasie osseuse. La libération, par les ostéoclastes activés, de certains facteurs (e.g. protons et/ou lipides), serait capable d'activer et de sensibiliser les canaux ASIC3 présents au niveau des fibres nociceptives, participant ainsi à l'arthralgie.