



Université de Liège
Faculté de Médecine
Département des Sciences de la Motricité
Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage
Arthropôle Liège
Professeur Yves Henrotin

Études *in vitro* et clinique d'actifs nutritionnels pour la prise en charge de l'arthrose chez le chien

Fanny Comblain

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques
Promoteur : Professeur Yves Henrotin
Co-promoteur : Docteur Samuel Serisier

Année académique 2015-2016

Au terme de ce travail, j'ai le plaisir d'adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

Monsieur le Professeur Y. Henrotin, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein de votre Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage et pour m'avoir fait confiance. Votre expertise scientifique, votre motivation débordante et communicative, votre curiosité insatiable, votre optimisme, votre disponibilité et vos innombrables et inestimables conseils ont permis de mener à bien ce travail. Je vous remercie pour vos relectures minutieuses de ce manuscrit. C'est un réel plaisir de travailler dans l'ambiance agréable, conviviale et sérieuse qui règne au sein de votre laboratoire.

Monsieur le Professeur M. Balligand, Messieurs les Docteurs Nicolas Barthélémy et Michaël Lefèbvre, je tiens à vous remercier pour votre accueil, vos compétences inappréciables, vos avis éclairés, votre aide et votre bonne humeur.

Monsieur le Professeur P. Drion, Président du Comité et du Jury de thèse, et les Membres de ces mêmes Comités, je vous adresse ma reconnaissance pour vos remarques et commentaires enrichissants et constructifs. Je remercie les Membres du Comité de lecture de ce mémoire d'avoir accepté de lire et de porter un regard critique sur ce travail.

Mesdames les Docteurs Cécile Lambert et Christelle Sanchez, je vous remercie particulièrement pour votre expérience scientifique, qui a contribué au bon déroulement de ce projet.

Merci à Monsieur le Docteur Cédric Schwartz pour sa disponibilité, ses compétences et sa gentillesse.

Madame et Messieurs les Docteurs Frédéric Bascon, Alexandre Feugier, Isabelle Lesponne, Samuel Serisier, Yannick Soulard, et les autres employés de Royal Canin SAS, je vous remercie pour votre confiance, votre accueil chaleureux, votre enthousiasme, votre compréhension et votre patience. Je suis très heureuse d'avoir eu l'opportunité de travailler avec vous pendant ces années. Un merci spécifique à Alexandre pour ses connaissances et ses enseignements statistiques. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Royal Canin SAS pour son soutien financier.

Monsieur le Docteur Jean-Emile Dubuc, et collaborateurs, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre coopération précieuse.

Messieurs les Docteurs Alexandre Bongartz, Fabien Gabriel et Marc Simon, je souhaite vous manifester ma gratitude pour la confiance que vous avez accordée à ce projet.

Madame le Docteur Anne-Françoise Donneau, merci pour votre amabilité et vos compétences statistiques.

Monsieur le Docteur Benoît Hennuy, merci pour votre support technique et vos instructions.

Catherine, Cécile, Céline, Christelle et Prescilia, l'équipe actuelle de l'Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage, mais aussi Frédéric, Laurence et Sébastien, les « anciens », un énorme merci pour votre bonne humeur quotidienne, votre savoir-faire, votre écoute, votre soutien, vos encouragements perpétuels et votre aide. Merci également à François, Jean-Paul, Laurence, Pascal et Pauline pour l'atmosphère chaleureuse qu'ils font régner au sein du 5^{ème} étage.

Merci aux Membres des sociétés spin-off Artialis et KiOmed Pharma pour leur soutien scientifique. Un merci spécifique à Mesdames les Docteurs Christelle Boileau et Anne Cornet, Alain Labasse et Sébastien Taralla pour leur enseignement et leur expérience.

Merci au Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement et au Laboratoire de Recherche sur les Métastases pour les expérimentations que j'y ai réalisées.

Merci à l'Abattoir Public de Liège pour la fourniture des prélèvements de cartilage bovin.

Merci aux propriétaires des chiens ayant accepté de participer sérieusement à l'étude, de respecter ses contraintes et d'y consacrer une part de leur temps.

Merci à Thierry, à mes parents, à ma famille et à mes amis pour leur soutien irremplaçable, leur compréhension, leur patience et leurs encouragements incessants. Ce travail n'aurait pu aboutir sans leur présence.

D'emblée, je vous souhaite à toutes et tous une lecture agréable.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a joint disease with high prevalence and significant socio-economic impact. This disease affects humans but also dogs. Nowadays, no cure exists, and the pharmacological treatment is limited to symptoms alleviation. Unfortunately, the use of some pharmacological treatment may be associated with detrimental effects, especially after long-term use.

In this context, there is a real need of new therapeutics targets and of safe and efficient therapies. Some positive beneficial effects have been highlighted with nutraceuticals in the course of OA. The objectives of this study were to select some nutraceuticals showing synergistic beneficial effects on chondrocytes metabolism, to investigate their *in vitro* mechanisms of action and to evaluate the effects of these nutraceuticals *in vivo* in OA dogs.

In the first part of this work, we evaluated nutraceuticals effects *in vitro* on key pathways implicated in chondrocytes metabolism. We also identified new nutraceuticals targets by using genomic approach. In the second part, we studied the effects of these nutraceuticals *in vivo* in OA dogs.

In vitro, we showed that curcuminoids extract, hydrolysed collagen and green tea extract acted synergically to inhibit inflammatory, catabolic and anabolic mediators' synthesis. Genomic analyses demonstrated that the expression of many genes implicated in OA specific key pathways was affected by these three nutraceuticals.

Dog study highlighted that the mixture of the three nutraceuticals had no adverse effect and improved algo-functional status of OA dogs.

These findings give a supplementary scientific rationale for the use of these nutraceuticals in the management of OA.

1	OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....	1
2	INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	3
2.1	L'articulation synoviale	3
2.1.1	Anatomie.....	3
2.1.2	Le cartilage articulaire.....	4
2.1.2.1	Origine, caractéristiques et physiologie.....	4
2.1.2.2	Constitution.....	5
2.1.2.3	Architecture	11
2.1.3	L'os sous-chondral	13
2.1.4	La membrane synoviale	14
2.1.5	Le liquide synovial.....	16
2.1.5.1	Composition.....	17
2.2	L'arthrose	18
2.2.1	Définition et prévalence.....	18
2.2.2	Facteurs de risque.....	20
2.2.3	Modifications anatomo-pathologiques	22
2.2.3.1	Au niveau du cartilage articulaire	22
2.2.3.2	Au niveau de l'os sous-chondral	25
2.2.3.3	Au niveau de la membrane synoviale	26
2.2.3.4	Au niveau du liquide synovial	27
2.2.4	Physiopathologie de l'arthrose	28
2.2.4.1	Boucle cartilagino-cartilagineuse.....	29
2.2.4.2	Boucle ostéo-cartilagineuse.....	30
2.2.4.3	Boucle synovio-cartilagineuse.....	31
2.2.4.4	Les principaux médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'arthrose.....	32
2.3	Les recommandations pour le traitement de l'arthrose.....	39
2.4	L'arthrose chez le chien	43
2.4.1	La prise en charge de l'arthrose chez le chien.....	44
2.5	Les actifs nutritionnels.....	49
2.5.1	Collagène hydrolysé.....	50
2.5.2	Extrait de curcuminoïdes	50
2.5.3	Extrait de thé vert	52
3	PARTIE <i>IN VITRO</i>	55
3.1	Introduction	55

3.1.1	Objectifs.....	56
3.2	Matériel et méthodes.....	59
3.2.1	Origine des chondrocytes et déclaration éthique.....	59
3.2.2	Isolement des chondrocytes	59
3.2.3	Description des actifs	60
3.2.4	Culture des chondrocytes.....	62
3.2.5	Arrêt de la culture des chondrocytes	68
3.2.6	Mesure de la lactate déshydrogénase	68
3.2.7	Réaction de polymérisation en chaîne	68
3.2.8	Analyse génétique sur biopuces à ADN.....	69
3.2.9	Mesure de l'acide désoxyribonucléique.....	70
3.2.10	Mesure du nitrite.....	71
3.2.11	Mesure de la prostaglandine E ₂	71
3.2.12	Dosages immunologiques (EASIA) de l'agrécane, de la <i>bone morphogenetic protein-2</i> , du ligand à la chimiokine (motif C-X-C) 6, de l'interleukine-6, de la métalloprotéase matricielle-3 et -13, de la stanniocalcine 1 et de la serpine E1	72
3.2.13	Mesure des protéines totales.....	73
3.2.14	Immunotransfert de protéines.....	74
3.2.15	Analyses statistiques	74
3.3	Résultats	76
3.3.1	Étude comparative des effets des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes bovins	76
3.3.1.1	Les paramètres inflammatoires.....	76
3.3.1.2	Les paramètres cataboliques.....	86
3.3.1.3	Les paramètres anaboliques	90
3.3.1.4	Résumé.....	93
3.3.2	Étude des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert sur le métabolisme des chondrocytes bovins.....	95
3.3.2.1	Les paramètres inflammatoires.....	95
3.3.2.2	Les paramètres cataboliques.....	100
3.3.2.3	Les paramètres anaboliques	103
3.3.2.4	Résumé.....	104
3.3.3	Étude de mélanges sur le métabolisme des chondrocytes bovins	105
3.3.3.1	Les paramètres inflammatoires.....	105
3.3.3.2	Les paramètres cataboliques.....	108
3.3.3.3	Les paramètres anaboliques	110

3.3.3.4	Résumé.....	112
3.3.4	Étude des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert, seuls ou en mélange, sur le métabolisme des chondrocytes humains	113
3.3.4.1	Les paramètres inflammatoires	113
3.3.4.2	Les paramètres cataboliques	116
3.3.4.3	Les paramètres anaboliques	118
3.3.4.4	Résumé.....	119
3.3.4.5	Voie de signalisation NF-κB.....	121
3.3.5	Analyse génétique sur biopuces à ADN	122
3.3.5.1	Gènes et protéines d'intérêt.....	123
3.4	Discussion.....	130
4	PARTIE <i>IN VIVO</i>	139
4.1	Introduction	139
4.2	Population et protocole	142
4.2.1	Population	142
4.2.2	Aliments de l'étude.....	144
4.2.3	Conception de l'étude.....	145
4.2.4	Effets indésirables	147
4.2.5	Plateforme de marche	148
4.2.6	Biomarqueurs de l'arthrose	148
4.2.7	Évaluation par le vétérinaire.....	149
4.2.8	Évaluation par le propriétaire	150
4.2.9	Analyses statistiques.....	151
4.3	Résultats.....	152
4.3.1	Chiens.....	152
4.3.2	Tolérance et innocuité	153
4.3.3	Plateforme de marche	153
4.3.4	Biomarqueurs de l'arthrose	155
4.3.5	Évaluation par le vétérinaire.....	155
4.3.6	Évaluation par le propriétaire	157
4.4	Discussion.....	160
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	165
6	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
7	ANNEXES.....	195

AASAL	anti-arthrosique symptomatique d'action lente
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AGG	agrécane
AH	acide hyaluronique
AINS	anti-inflammatoire non-stéroïdien
ANKH	<i>progressive ankylosis protein homolog</i>
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BCA	<i>bicinchoninc acid</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein-2</i>
BRB	<i>Biometric Research Branch</i>
BSA	albumine sérique de bœuf
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
C	extrait de curcuminoïdes
CBPI	<i>Canine Brief Pain Inventory</i>
CCL	ligand à la chimiokine (motif C-C)
CDG	centre de gravité
CH	chromemate
ChM-1	chondromoduline-1
CILP	<i>cartilage intermediate layer protein-1</i>
C_{max}	concentration maximale
COL2	collagène de type II
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
COT	un mélange d'extrait de curcuminoïdes, de collagène hydrolysé et d'extrait de thé vert
COX	cyclooxygénase
CS	chondroïtine sulfate
ctrl	contrôle

CXCL	ligand à la chimiokine (motif C-X-C)
DHA	acide docosahexaénoïque
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EASIA	<i>enzyme amplified sensitivity immunoassay</i>
EGCG	épigallocatechine-3-gallate
EPA	acide eicosapentaénoïque
F	force
FBS	<i>foetal bovine serum</i>
FRS	force de réaction au sol
GAG	glycosaminoglycane
GDF5	<i>growth differentiation factor 5</i>
G-HCl	glucosamine hydrochloride
GLM	<i>green lipped mussel</i>
GLUT	transporteur du glucose
H₂O	eau
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄	acide sulfurique
H₃PO₄	acide phosphorique
HCA-SX	acide hydroxycitrique
HCl	acide chlorhydrique
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF-1α	<i>hypoxia inducible factor-1α</i>
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransférase
HRP	peroxydase <i>horse-radish</i>
HSC	<i>heat shock cognate</i>
ID	interférence de la douleur
IFI44L	<i>interferon-induced protein 44-like</i>
Ig	immunoglobuline
IIA	injection intra-articulaire
IκB	inhibiteur d'NF- κ B
IL	interleukine

IL-1R	récepteur à l'interleukine-1
iNOS	synthase d'oxyde nitrique inducible
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IV	impulsion verticale
KS	kératane sulfate
LDH	lactate déshydrogénase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MMP	métalloprotéase matricielle
NaCl	chlorure de sodium
NaNO₂	nitrite de sodium
NC	domaine non collagénique
NF	nuclear factor
NO	oxyde nitrique
NO₂	nitrite
NOS2A	synthase d'oxyde nitrique
O	collagène hydrolysé
O₂	oxygène
O₂⁻	anion superoxyde
OA	<i>osteoarthritis</i>
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
·OH	anion hydroxyle
ONOO⁻	peroxynitrite
p	p-valeur
PA	phosphatase alcaline
PAI	inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PFV	pic de force verticale
PG	protéoglycane
PGE₂	prostaglandine E ₂
PRELP	<i>proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
pro-hyp	proline-hydroxyproline

PTGES	synthase de prostaglandine E
PTGS	synthase de prostaglandine-endoperoxyde
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related protein</i>
qPCR	réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
SD	sévérité de la douleur
SEM	erreur type
SMAD3	<i>mothers against decapentaplegic homologue 3</i>
SMC	score de masse corporelle
SOD	superoxyde dismutase
STC1	stanniocalcine 1
T	extrait de thé vert
T0	début de l'étude
T1	1 mois après le début de l'étude
T2	2 mois après le début de l'étude
T3	fin de l'étude, 3 mois après le début de l'étude
THC	tétrahydrocurcumine
THF	tétrahydrofurane
TIMP	inhibiteur tissulaire de métalloprotéases
TMB	3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFAIP	<i>tumor necrosis factor alpha induced protein</i>
TSP-1	thrombospondine-1
UC-II	collagène de type II glycosylé non-dénaturé
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

g	gramme
h	heure
Hz	hertz
kcal	kilocalorie
kg	kilogramme
L	litre
M	molaire
MDa	mégadalton
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
mm	millimètre
mm³	millimètre cube
ng	nanogramme
nm	nanomètre
Pa	pascal
pg	picogramme
sec	seconde
U	unité
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire
µm	micromètre
°C	degré Celsius
%	pourcent

Figure 1. Structure générale d'une articulation synoviale	4
Figure 2. Représentation schématique de l'organisation de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire	6
Figure 3. Modèle de la détection de l'hypoxie par les chondrocytes.....	8
Figure 4. Représentation schématique d'une molécule d'agrécan.....	9
Figure 5. Représentation schématique des compartiments de la matrice extracellulaire du cartilage.....	11
Figure 6. Architecture en couches du cartilage articulaire.....	13
Figure 7. Coupe histologique de cartilage articulaire et d'os.....	13
Figure 8. Photographie de l'ultrastructure des deux types de synoviocytes de l' <i>intima</i> d'une membrane synoviale de rat	15
Figure 9. Structure chimique de l'acide hyaluronique.....	16
Figure 10. Représentation planétaire de l'arthrose selon Y. Henrotin.....	19
Figure 11. Pourcentage de la population souffrant d'arthrose, selon le sexe et l'âge, en Belgique	20
Figure 12. Photographie d'un plateau tibial arthrosique	22
Figure 13. Coupes histologiques représentatives des diverses altérations du cartilage arthrosique.....	24
Figure 14. Photographie d'une coupe histologique représentant le remodelage de l'os sous-chondral lors du processus arthrosique	25
Figure 15. Représentation des boucles cartilagino-cartilagineuse, ostéo-cartilagineuse et synovio-cartilagineuse selon Y. Henrotin.....	29
Figure 16. Voie de signalisation intra-cellulaire associée à l'IL-1 β et ses effets.....	34
Figure 17. Schéma représentant un résumé de la physiopathologie de l'arthrose	38
Figure 18. Recommandations de l'OARSI pour le traitement non-chirurgical de l'arthrose.	41
Figure 19. Représentation pyramidale des traitements pour la prise en charge de la gonarthrose et de leurs limitations	42
Figure 20. Facteurs de risques de l'arthrose chez le chien.....	43
Figure 21. Structure chimique de la curcumine, sous sa forme énoI	51
Figure 22. Structure chimique de l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG)	53
Figure 23. Photographies de chondrocytes humains	62
Figure 24. Représentation schématique des différents protocoles réalisés sur les chondrocytes bovins	65
Figure 25. Représentation schématique des différents protocoles réalisés sur les chondrocytes humains.....	67
Figure 26. Schéma représentant le principe de la technique des biopuces à ADN.....	70
Figure 27. Production de NO ₂ par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	77
Figure 28. Production de NO ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	78

Figure 29. Production de NO ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1β, pré-incubés pendant 48 h avec l'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	79
Figure 30. Production de PGE ₂ par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	80
Figure 31. Production de PGE ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1β, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	81
Figure 32. Production de PGE ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1β, pré-incubés pendant 48 h avec l'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	81
Figure 33. Expression d'IL-6 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	82
Figure 34. Expression d'IL-6 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1β, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	83
Figure 35. Expression de COX2 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	83
Figure 36. Expression de COX2 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1β, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	84
Figure 37. Expression d'iNOS par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	85
Figure 38. Expression d'iNOS par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1β, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	85
Figure 39. Expression de MMP-3 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines	86

Figure 40. Expression de MMP-3 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	87
Figure 41. Expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	87
Figure 42. Expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	88
Figure 43. Expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	89
Figure 44. Expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	90
Figure 45. Expression d'AGG par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	90
Figure 46. Expression d'AGG par les chondrocytes bovins traités à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	91
Figure 47. Expression de collagène de type II par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	92
Figure 48. Expression du collagène de type II par les chondrocytes bovins traités à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.....	92
Figure 49. Justification de la sélection des trois actifs nutritionnels.....	95
Figure 50. Production de NO ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 12,5 μ g/ml et 62,5 μ g/ml.....	96
Figure 51. Production de PGE ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 12,5 μ g/ml et 62,5 μ g/ml.....	97

Figure 52. Expression d'IL-6 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$	98
Figure 53. Expression de COX2 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$	99
Figure 54. Expression d'iNOS par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$	100
Figure 55. Expression de MMP-3 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$	101
Figure 56. Expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$	102
Figure 57. Expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$	103
Figure 58. Production de NO ₂ et de PGE ₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$	107
Figure 59. Expression d'IL-6, COX2 et iNOS par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$	108
Figure 60. Expression de MMP-3, ADAMTS4 et ADAMTS5 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$	110
Figure 61. Expression d'AGG et du collagène de type II par les chondrocytes bovins traités à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$	111
Figure 62. Photographie de chondrocytes bovins primaires cultivés en monocouche	112
Figure 63. Production de NO ₂ par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$	114
Figure 64. Production d'IL-6 par les chondrocytes humains en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$	115
Figure 65. Production d'IL-6 par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$	116
Figure 66. Production de MMP-3 par les chondrocytes humains en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$	117

Figure 67. Production de MMP-3 par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$	118
Figure 68. Contenu en AGG dans les surnageants de culture de chondrocytes humains en conditions basales, lorsque ceux-ci étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$	119
Figure 69. Photographie de chondrocytes humains primaires cultivés en monocouche ...	121
Figure 70. Analyse par immunotransfert de protéines des effets des actifs nutritionnels C et COT sur les phosphorylations des sous-unités NF- κB p65 et I $\kappa\text{B}\alpha$, induites par l'IL-1 β	121
Figure 71. Tests de comparaison de classes entre les quatre conditions de l'analyse des biopuces à ADN (ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β)	123
Figure 72. Production de CXCL6 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β	126
Figure 73. Production de MMP-13 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β	127
Figure 74. Production de BMP-2 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β	128
Figure 75. Production de STC1 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β	129
Figure 76. Production de serpine E1 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β	129
Figure 77. Vues sagittale et frontale d'un chien en position debout	140
Figure 78. Exemple de graphe construit à partir des données acquises lorsqu'un chien trotte	141
Figure 79. Système d'évaluation de score de masse corporelle (SMC).....	143
Figure 80. Protocole de l'étude clinique randomisée, en double aveugle et avec un contrôle-placebo.....	147
Figure 81. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 du pic de force verticale (PFV) dans la population totale pour les groupes contrôle et COT.....	154
Figure 82. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 du pic de force verticale (PFV) dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes pour les groupes contrôle et COT.....	155
Figure 83. Moyenne \pm SEM pour la douleur à la manipulation de l'articulation dans la population totale pour les groupes contrôle et COT à T0 et à T3	156
Figure 84. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 de la sévérité de la douleur (SD) dans la population totale pour les groupes contrôle et COT.....	157
Figure 85. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 de la capacité à passer de la position allongée à la position debout dans la population totale pour les groupes contrôle et COT	158
Figure 86. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 de la sévérité de la douleur (SD) dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes pour les groupes contrôle et COT.....	159

Tableau 1. Variation des propriétés et de la composition du liquide synovial chez un individu sain et arthrosique	28
Tableau 2. Classification de l'arthrose selon quatre sous-phénotypes.....	40
Tableau 3. Résumé des effets des extraits nutritionnels chez le chien arthrosique	45
Tableau 4. Caractéristiques des treize actifs nutritionnels évalués lors de la phase 1 de sélection.....	60
Tableau 5. Séquences des primers bovins sens et anti-sens utilisés pour la qPCR.....	69
Tableau 6. Caractéristiques spécifiques des différents dosages immunologiques réalisés..	73
Tableau 7. Résumé des effets des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes bovins en conditions basales	93
Tableau 8. Résumé des effets des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes bovins en présence d'IL-1 β	94
Tableau 9. Résumé des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert sur le métabolisme des chondrocytes bovins en présence d'IL-1 β	104
Tableau 10. Effets des actifs nutritionnels, combinés par deux, sur la production et l'expression de médiateurs inflammatoires par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β	106
Tableau 11. Effets des actifs nutritionnels, combinés par deux, sur l'expression de médiateurs cataboliques par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β	109
Tableau 12. Effets des actifs nutritionnels, combinés par deux, sur l'expression de médiateurs anaboliques par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche traités à l'IL-1 β	111
Tableau 13. Résumé des effets du mélange de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert sur le métabolisme des chondrocytes bovins en présence d'IL-1 β	112
Tableau 14. Résumé des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert, seuls ou en mélange, sur le métabolisme des chondrocytes humains en conditions basales.....	120
Tableau 15. Résumé des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert, seuls ou en mélange, sur le métabolisme des chondrocytes humains en présence d'IL-1 β	120
Tableau 16. Gènes différemment exprimés entre les conditions IL-1 β et ctrl, COT IL-1 β et IL-1 β , COT et ctrl	124
Tableau 17. Contenu nutritionnel et énergétique des deux aliments de l'étude	145
Tableau 18. Système de scores cliniques de l'arthrose chez le chien	150
Tableau 19. Caractéristiques des chiens qui ont terminé l'étude	153
Tableau 20. Moyenne \pm SEM pour le membre le plus sévèrement atteint pour le pic de force verticale (PFV) de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=21) ou un aliment COT (n=21).....	154
Tableau 21. Moyenne \pm SEM pour le membre le plus sévèrement atteint pour le pic de force verticale (PFV) de 26 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=15) ou un aliment COT (n=11).....	154
Tableau 22. Moyenne \pm SEM pour les concentrations sériques des biomarqueurs Coll2-1 et Coll2-1NO ₂ de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=21) ou un aliment COT (n=21).....	155

Tableau 23. Moyenne \pm SEM pour la boiterie et pour le membre le plus sévèrement atteint pour la douleur à la palpation de l'articulation, la limitation à la mobilité de l'articulation et la douleur à la manipulation de l'articulation de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=21) ou un aliment COT (n=21) 156

Tableau 24. Moyenne \pm SEM pour la sévérité de la douleur (SD) et l'interférence de la douleur (ID) de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=21) ou un aliment COT (n=21) 157

Tableau 25. Moyenne \pm SEM pour la sévérité de la douleur (SD) et l'interférence de la douleur (ID) de 26 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=15) ou un aliment COT (n=11) 158

1 OBJECTIFS GÉNÉRAUX

L'arthrose est une pathologie articulaire complexe d'origine plurifactorielle dont la prévalence est élevée et le retentissement socio-économique important. À ce jour, il n'existe pas de traitement permettant de guérir cette maladie ou d'interagir considérablement avec sa progression. Les traitements pharmacologiques actuels se concentrent sur la prise en charge des symptômes de l'arthrose, mais ne modifient pas sensiblement l'évolution naturelle de la pathologie. Ils visent à réduire la douleur, le principal symptôme de l'arthrose. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et le paracétamol restent fréquemment prescrits par les médecins. Néanmoins, ces traitements sont généralement associés à des effets indésirables limitant leur utilisation à long terme.

Dans ce contexte, il est urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer une thérapie alternative plus saine et plus efficace. Celle-ci pourrait provenir de la nutrition. En effet, outre le fait que l'arthrose soit une maladie chronique, la nutrition peut fournir des bénéfices à long terme. Beaucoup d'extraits nutritionnels ont déjà été étudiés, avec différents niveaux de validité scientifique. L'attractivité d'une nutrition adaptée se trouve aussi dans le fait qu'elle est exempte d'effets secondaires néfastes, contrairement aux traitements pharmacologiques. Par ailleurs, l'absence de traitement renforce l'importance de la prévention.

En outre, l'arthrose ne touche pas uniquement les humains, mais également les animaux et, notamment, les chiens. En effet, 20 % des chiens âgés de plus d'un an présentent de l'arthrose, à des stades de sévérité variés. Comme chez l'humain, l'arthrose canine s'accompagne d'une perte de la mobilité articulaire et d'une sédentarisation progressive.

Les objectifs de notre travail étaient :

- de sélectionner des actifs nutritionnels présentant des effets synergiques sur le métabolisme des chondrocytes. La sélection a été réalisée en tenant compte non seulement de l'activité biologique de ces actifs, mais aussi des contraintes réglementaires, d'industrialisation et de production ;

- d'étudier *in vitro* les mécanismes d'action des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes ;
- d'évaluer *in vivo* les effets d'un mélange d'actifs nutritionnels chez des chiens souffrant d'arthrose.

Cette thèse a été financée par Royal Canin SAS dans le but de mettre au point un nouvel aliment, destiné aux chiens souffrant d'arthrose et se différenciant par rapport aux autres alimentations canines déjà présentes sur le marché. Elle s'inscrit par conséquent dans un contexte à la fois académique et industriel.

2 INTRODUCTION GÉNÉRALE

2.1 L'articulation synoviale

2.1.1 Anatomie

Selon le dictionnaire de la langue française *Larousse*, l'articulation est définie en anatomie comme étant la « région de contact entre deux pièces dures, assurant la mobilité relative de ces deux pièces ou leur emboîtement en position fixe ». La juxtaposition se réalise généralement entre deux extrémités osseuses ou entre un os et une dent. Les articulations peuvent être classées selon leur fonction ou selon leur morphologie. La classification morphologique des articulations s'effectue selon leur composition. On distingue les articulations fibreuses, composées de tissu fibreux (par exemple gomphose entre un os et une dent), les articulations cartilagineuses, réunies par du cartilage (par exemple les articulations intervertébrales) et enfin, les articulations synoviales, composées d'une capsule fibreuse contenant du liquide synovial (par exemple l'articulation du genou).

L'articulation synoviale est constituée de divers tissus interagissant entre eux. La capsule articulaire est une enveloppe fibreuse entourant l'articulation. La membrane synoviale tapisse la face interne de la capsule et circonscrit, avec le cartilage articulaire, le volume de la cavité articulaire. Le liquide articulaire ou liquide synovial est sécrété dans la cavité articulaire par la membrane synoviale. Le cartilage articulaire constitue le revêtement des extrémités osseuses. L'os situé directement sous le cartilage est appelé os sous-chondral (Figure 1). Des ligaments latéraux et des ligaments intra-articulaires aident à stabiliser l'articulation. Il existe parfois au sein de certaines articulations des fibrocartilages (tels que le ménisque) qui s'interposent entre les surfaces cartilagineuses et favorisent la congruence des surfaces articulaires [1]. Les différents tissus établissant l'articulation synoviale possèdent des rôles et des propriétés spécifiques sans lesquels la fonction et l'intégrité de l'articulation seraient perdues.

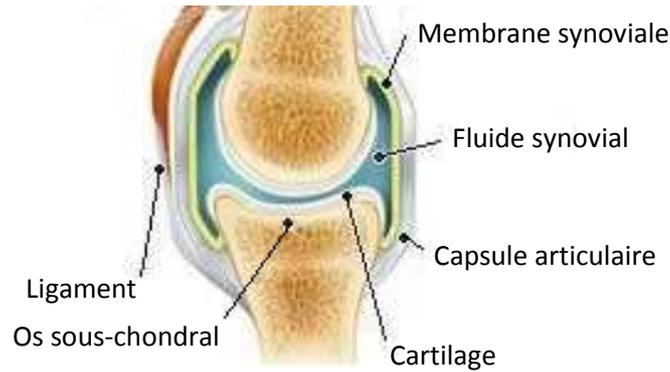


Figure 1. Structure générale d'une articulation synoviale. Adapté d'après Campbell et Reece, 2006 [2].

L'articulation synoviale est généralement caractérisée par une grande mobilité. La majorité des articulations du corps humain (épaule, coude, hanche, genou) appartiennent à ce type d'articulations [1].

2.1.2 Le cartilage articulaire

2.1.2.1 Origine, caractéristiques et physiologie

Le cartilage est un tissu conjonctif, issu des cellules mésenchymateuses, qui possède plusieurs particularités structurelles et fonctionnelles. Le cartilage qui recouvre les extrémités osseuses au sein des articulations synoviales est du cartilage hyalin. Le cartilage hyalin sain possède un aspect blanc, lisse, brillant et légèrement translucide. Son épaisseur est d'environ 2,4 mm, mais peut varier selon les articulations [3]. Le cartilage des articulations synoviales possède deux fonctions principales :

- la fonction statique dont les objectifs sont d'assurer une répartition harmonieuse des pressions qui s'exercent sur l'articulation, d'amortir les chocs et les contraintes subies et, par conséquent, de résister aux pressions et forces de cisaillement importantes [4] ;
- la fonction dynamique, assurée en association avec le liquide synovial, dont l'objectif est de diminuer les forces de friction qui se manifestent lors du déplacement des pièces osseuses [5].

La perméabilité du cartilage a une grande importance, car elle influence sa nutrition [6]. La nutrition du cartilage se fait par imbibition du liquide synovial et grâce

aux vaisseaux de l'os sous-chondral [7]. À l'état adulte sain, le cartilage est un tissu extrêmement quiescent.

Une des particularités du cartilage articulaire est qu'il est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de structures nerveuses [5]. Par ailleurs, il est constitué d'un seul type de cellules spécialisées, les chondrocytes, enchâssés dans la matrice extracellulaire.

2.1.2.2 Constitution

2.1.2.2.1 Chondrocytes

Le cartilage articulaire est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes. Ils occupent 1 à 10 % du volume du cartilage [3, 8]. Le chondrocyte est de forme sphérique ou ovoïde et mesure de 30 à 40 μm de diamètre. La densité cellulaire varie en fonction du type d'articulation, de la localisation des cellules au sein du cartilage et selon l'âge de l'individu. Elle a été évaluée à 9626 cellules par mm^3 [3, 8]. Au cours du vieillissement, la densité cellulaire diminue progressivement [8]. Les chondrocytes possèdent tous les organites nécessaires à la synthèse et à la maturation de protéines à destinée intra- et extracellulaire : un noyau volumineux, des mitochondries, des ribosomes, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi et des vacuoles lysosomiales. Il n'existe pas de contact intercellulaire direct au sein de la matrice cartilagineuse [1]. Cependant, les chondrocytes sont capables de répondre à des stimuli variés, incluant des facteurs de croissance, des charges mécaniques, des stimuli piézoélectriques et des pressions hydrostatiques [5]. Malheureusement, les chondrocytes sont incapables de se multiplier, ce qui contribue à la capacité limitée de réparation du cartilage.

En raison du caractère avasculaire du tissu cartilagineux, le chondrocyte évolue dans un environnement caractérisé par une faible tension en oxygène (de l'ordre de 5 à 10 % de pression en O_2) par rapport à celle trouvée dans la plupart des tissus [9]. La glycolyse anaérobie est donc la voie métabolique privilégiée du chondrocyte, qui utilise essentiellement le glucose provenant du liquide synovial comme substrat énergétique [10]. Les chondrocytes assurent la synthèse et le renouvellement de la matrice extracellulaire du cartilage [11]. Ils garantissent ainsi un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation de protéines telles que

des protéines matricielles, des protéases ou des inhibiteurs de protéases, et ils participent au maintien de l'homéostasie du tissu.

2.1.2.2 Matrice extracellulaire

A. Composition

La matrice extracellulaire du cartilage articulaire normal est principalement composée d'eau (65 à 80 % du poids frais) et de macromolécules telles que des protéoglycanes (PG) (10 % du poids frais, dont 90 % sont des agrécans (AGG)) et des collagènes (10 à 20 % du poids frais), ainsi que d'autres molécules minoritaires (lipides, phospholipides, protéines non-collagène et glycoprotéines) (Figure 2) [5, 12]. La matrice extracellulaire est riche en cations qui équilibrent les charges négatives des groupements carboxylates et sulfates des PG et qui attirent les molécules d'eau [13].

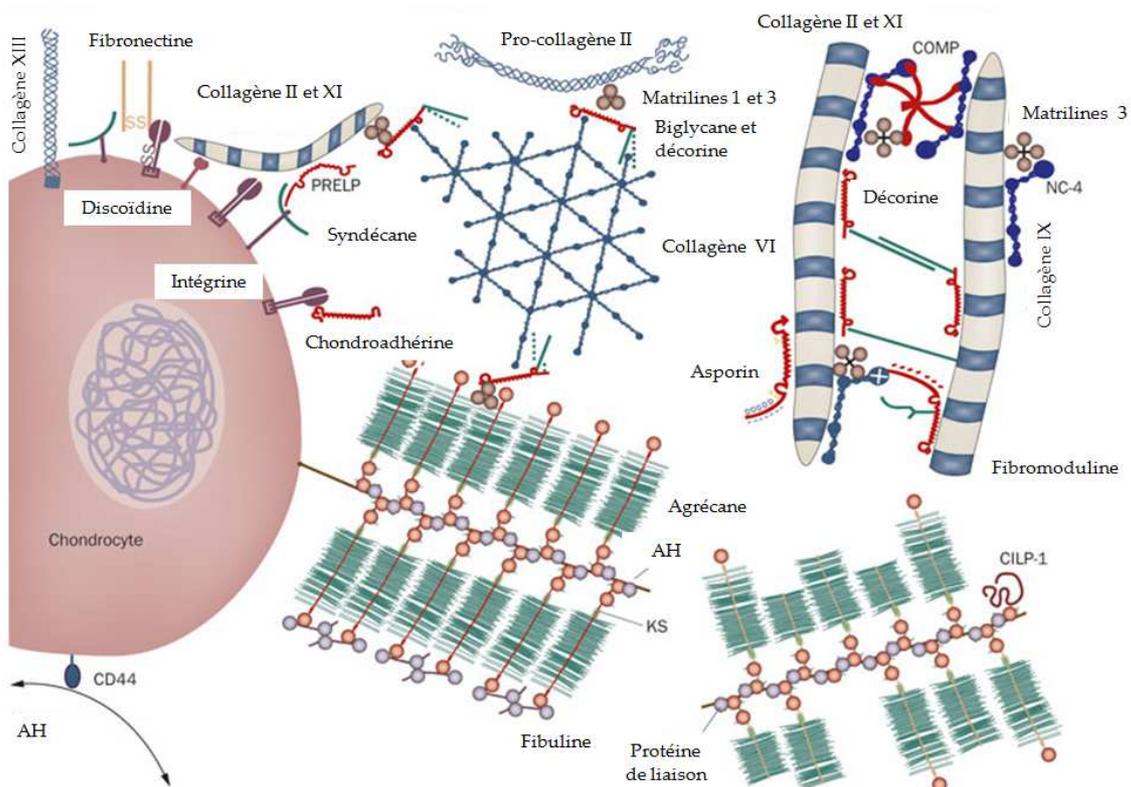


Figure 2. Représentation schématique de l'organisation de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. Adapté d'après Heinegard et al., 2011 [14]. AH=Acide Hyaluronique; CILP=Cartilage Intermediate Layer Protein-1; COMP=Cartilage Oligomeric Matrix Protein; CS=Chondroïtine Sulfate; KS=Kératane Sulfate; NC=domaine non collagénique; PRELP=Proline-arginine-Rich End Leucine-rich repeat Protein.

a) Eau

L'eau est le composé le plus abondant de la matrice extracellulaire. Approximativement 30 % de l'eau du cartilage articulaire se situe dans l'espace intra-fibrillaire des molécules de collagène [15]. L'eau existe aussi sous une forme liée aux PG ; ce qui confère au cartilage ses propriétés de résistance aux compressions [12]. Les flux d'eau aident à transporter et à amener les nutriments aux chondrocytes et à évacuer les déchets métaboliques. L'eau apporte également une certaine lubrification au cartilage articulaire [5].

b) Protéoglycanes

Les PG sont des protéines monomériques extrêmement glycosylées. Elles sont constituées d'une protéine axiale sur laquelle sont greffées de manière covalente des chaînes polysidiques dénommées glycosaminoglycanes (GAG). Les chaînes de GAG peuvent être composées de plus de 100 monosaccharides [5]. Les GAG du cartilage regroupent l'acide hyaluronique (AH), la chondroïtine sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate et le dermatane sulfate. Le glucose utilisé pour la synthèse des PG est essentiellement dégradé par les chondrocytes par la voie de la glycolyse anaérobie, et converti en glucosamine [16]. Les chondrocytes se trouvant dans un environnement pauvre en oxygène, la glycolyse anaérobie est la principale source de production d'adénosine triphosphate (ATP) dans le cartilage. En réponse à l'hypoxie, l'expression du *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α) est augmentée. HIF-1 α induit alors la synthèse des transporteurs du glucose (GLUT) 1 et GLUT3 [17]. Le glucose peut alors migrer à l'intérieur du chondrocyte pour être métabolisé (Figure 3).

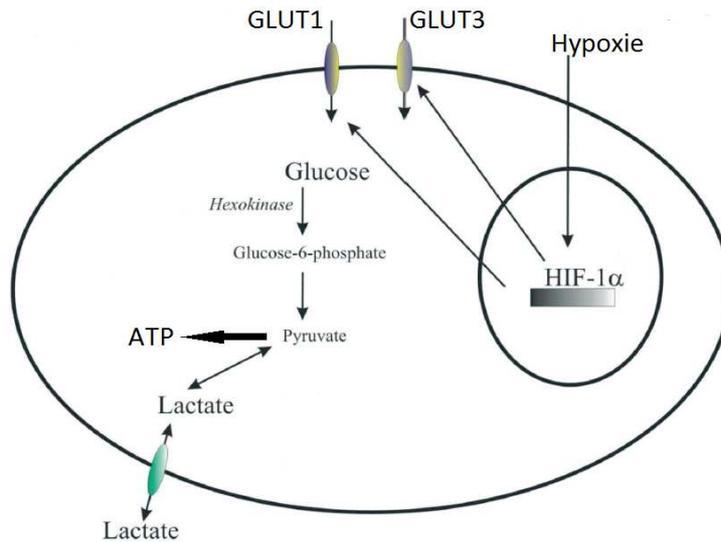


Figure 3. Modèle de la détection de l'hypoxie par les chondrocytes. Adapté d'après Mobasher et al., 2005 [17].

Il existe deux classes de PG :

- les AGG, grands et larges monomères capables de s'agréger, sont formés d'une protéine axiale (225-250 kDa) sur laquelle se fixent de façon covalente une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate et une trentaine de chaînes de kératane sulfate. La masse moléculaire des AGG est supérieure à 2500 kDa [18, 19]. Les AGG sont caractérisés par leur capacité à interagir avec l'AH via le domaine globulaire. Cette liaison est stabilisée par une petite glycoprotéine « link protein » (Figure 4). Plus de trois cents molécules d'AGG peuvent s'associer sur une molécule d'AH et ainsi former un agrégat [18]. Les AGG fournissent au cartilage ses propriétés osmotiques, essentielles à sa résistance aux compressions ;
- les plus petits PG tels que la décorine, le biglycane et la fibromoduline appartiennent à la famille des protéines riches en leucine. Ils ne s'agrègent pas entre eux, mais sont caractérisés par leur capacité à interagir avec le collagène. Ces trois molécules diffèrent par leur composition en GAG. Le biglycane est formé de deux chaînes de dermatane sulfate alors que la décorine n'est formée que d'une seule chaîne. La fibromoduline est constituée de plusieurs chaînes de kératane sulfate. La fonction de ces petits PG est d'aider à stabiliser la matrice [5].

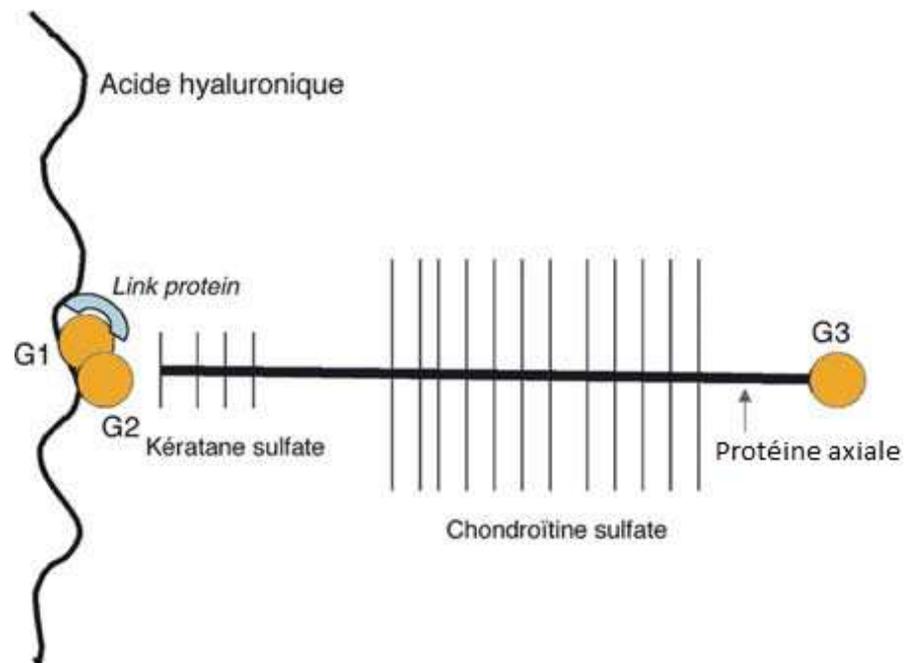


Figure 4. Représentation schématique d'une molécule d'agrécane. G=domaine globulaire. Adapté d'après Chevalier et Richette, 2005 [1].

c) Collagènes

Le collagène de type II représente 90 % du collagène du cartilage articulaire adulte sain. Il appartient à la famille des collagènes fibrillaires, c'est-à-dire comprenant une région hélicoïdale formée par l'enroulement de trois chaînes polypeptidiques. Le collagène de type II est composé de trois chaînes polypeptidiques identiques $\alpha 1$. Une chaîne est caractérisée par une séquence répétitive glycine-proline-hydroxyproline. Le collagène de type II confère au cartilage sa résistance au cisaillement et à la compression. Les fibrilles de collagène de type II sont entrelacées avec les agrégats de PG et forment le réseau tridimensionnel du cartilage [5, 20, 21].

Le collagène de type VI possède deux courts domaines en triple hélice et un important domaine globulaire terminal. Il se localise à la surface des chondrocytes et intervient dans l'adhésion de ceux-ci avec la matrice [20].

Le collagène de type IX appartient à un groupe différent des collagènes fibrillaires. En effet, une de ses chaînes polypeptidiques glycosylées devient un groupement chondroïtine sulfate. Il se lie aux chaînes de collagène de type II. Il assure la liaison entre les fibrilles de collagène de type II et ainsi stabilise le réseau formé par celles-ci [1, 20, 21].

Le collagène de type X se dépose autour des chondrocytes de la zone minéralisée du cartilage articulaire et autour des chondrocytes hypertrophiques du cartilage de croissance. Il s'organise en réseaux ou en filaments. Il semble impliqué dans les processus de minéralisation de la matrice extracellulaire [1, 20].

Le collagène de type XI, d'organisation fibrillaire, se localise à l'intérieur des fibrilles de collagène de type II auxquelles il se lie afin de réguler leur organisation tridimensionnelle et leur diamètre [20, 21].

d) Molécules minoritaires

En plus des PG et des collagènes, la matrice extracellulaire comporte de nombreuses autres protéines regroupées sous le terme de « glycoprotéines et protéines non collagéniques ». Leur fonction spécifique n'est pas encore complètement caractérisée, mais il semblerait que la plupart d'entre elles jouent un rôle dans l'architecture et le maintien tridimensionnel de la matrice extracellulaire.

La chondroadhérine appartient à la famille des protéines riches en leucine, comme la décorine, le biglycane et la fibromoduline. Elle est principalement impliquée dans les phénomènes d'interaction cellulaire via son récepteur, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, et interagit avec le collagène de type II [22, 23].

La fibronectine est une glycoprotéine qui possède un site de liaison aux intégrines et des sites d'interaction avec différents collagènes et avec l'AH [1].

La *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) interagit avec les fibrilles de collagène afin de maintenir l'organisation de la matrice et avec l'AGG et la chondroïtine sulfate en présence de Ca^{++} [24].

B. Structure

La matrice extracellulaire du cartilage contient une unité structurelle et métabolique particulière appelée le chondron (Figure 5). Ce dernier inclut le chondrocyte bordé par une matrice péricellulaire puis par une capsule fibreuse péricellulaire. Le chondron est lui-même entouré par la matrice territoriale et par la matrice interterritoriale [25].

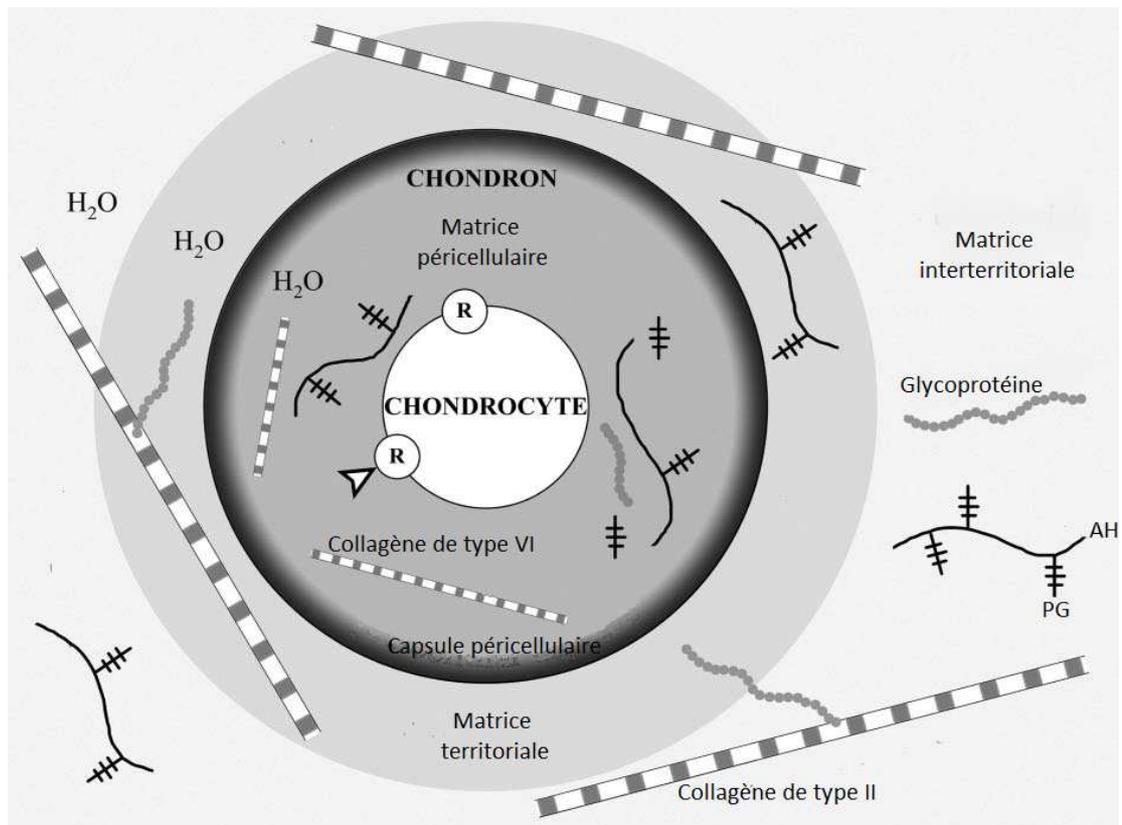


Figure 5. Représentation schématique des compartiments de la matrice extracellulaire du cartilage. Adapté d'après Sobol et al., [26].

La matrice péri-cellulaire est riche en AH, en PG sulfatés, en biglycanes et en glycoprotéines. La capsule péri-cellulaire se compose de fibrilles de collagène de type VI et de fibronectine. Ensemble, elles assurent la protection hydrodynamique du chondrocyte contre les pressions excessives [25].

Les matrices territoriale et interterritoriale contiennent des PG, principalement des AGG, ainsi que des collagènes de type II, IX et XI [20].

2.1.2.3 Architecture

Le cartilage articulaire est décrit en couches superposées qui se différencient entre elles essentiellement par des critères biochimiques et anatomiques. Il existe une zone acellulaire à la surface du cartilage nommée *lamina splendata*. Cette zone permet l'accrochage de macromolécules présentes dans le liquide synovial et constitue une couche protectrice pour le cartilage. L'AH, certains phospholipides et la lubriline recouvrent cette surface pour former un film protecteur diminuant le coefficient de friction entre les surfaces articulaires [10, 27].

Quatre zones successives sont décrites de la surface du cartilage jusqu'à l'interface cartilage/os sous-chondral (Figure 6) :

- la zone superficielle représente 5 à 10 % de l'épaisseur du cartilage. Les chondrocytes y sont petits et plats, de forme ovale. Cette couche est constituée de fibrilles de collagènes de type I et III [28]. Celles-ci sont disposées parallèlement à la surface et permettent par conséquent une résistance aux forces de tension. Cette strate est riche en fibronectine et en eau, mais relativement pauvre en PG [1, 29] ;
- la zone intermédiaire ou moyenne constitue 40 à 45 % de la hauteur du cartilage. Les chondrocytes présents sont volumineux, sphériques et disposés de manière aléatoire. Les fibres de collagène s'entrecroisent obliquement pour former un réseau. La teneur en PG augmente en comparaison de la zone superficielle [1, 29] ;
- la zone profonde ou radiale s'étend sur 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage. Les chondrocytes sphériques y sont disposés en colonne le long des travées épaisses de collagène de type II, perpendiculaires à la surface du cartilage. Cette couche est la plus riche en PG [1, 30] ;
- la zone calcifiée occupe 5 à 10 % de la hauteur du cartilage. Elle repose sur le plateau osseux sous-chondral. Les chondrocytes en nombre moindre conservent leur disposition en colonnes et expriment un phénotype hypertrophique caractérisé par la synthèse de collagène de type X. Les fibres de collagène gardent une orientation radiaire, mais sans continuité avec les fibres de collagène de l'os sous-jacent. Cette strate est pauvre en PG, mais la concentration en calcium est élevée. Une ligne de démarcation basophile et ondulée, la « tidemark », sépare la zone calcifiée de la zone profonde. Cette barrière interdit la pénétration des vaisseaux présents dans l'os sous-chondral [1, 30].

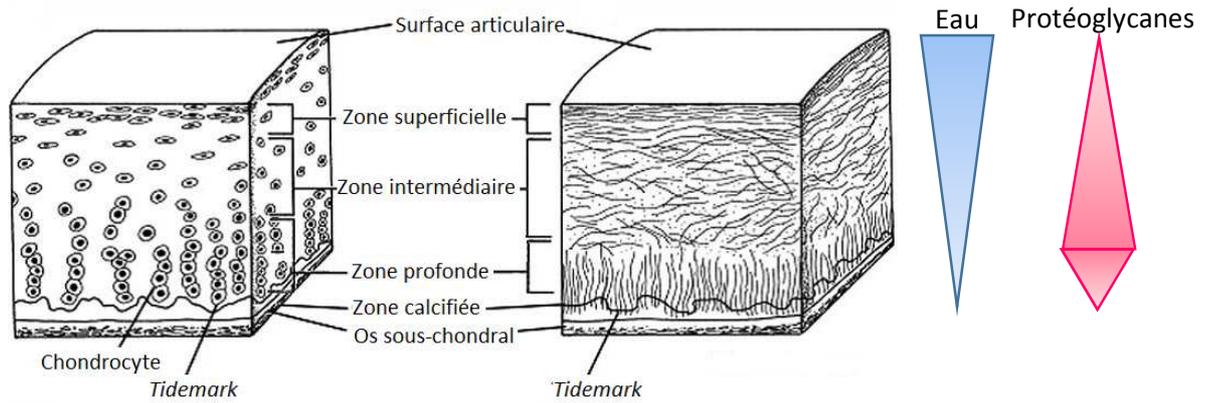


Figure 6. Architecture en couches du cartilage articulaire. Adapté d'après Sophia Fox et al., 2009 [5].

2.1.3 L'os sous-chondral

L'os sous-chondral est la partie osseuse sur laquelle repose le cartilage articulaire. L'épaisseur de l'os sous-chondral normal varie entre 0,1 et 2 mm, mais peut atteindre jusqu'à 3 mm dans les régions à fortes contraintes mécaniques. Cet os est composé de deux parties : le plateau osseux sous-chondral et un segment de l'os trabéculaire sous-jacent. Le plateau osseux sous-chondral est formé d'os cortical, poreux et vascularisé, qui permet des échanges entre l'os et le cartilage. En effet, il se situe précisément entre la couche calcifiée du cartilage et l'os trabéculaire. Le plateau osseux sous-chondral forme, avec la couche calcifiée du cartilage, un ensemble fonctionnel appelé plaque ostéochondrale (Figure 7) [31].

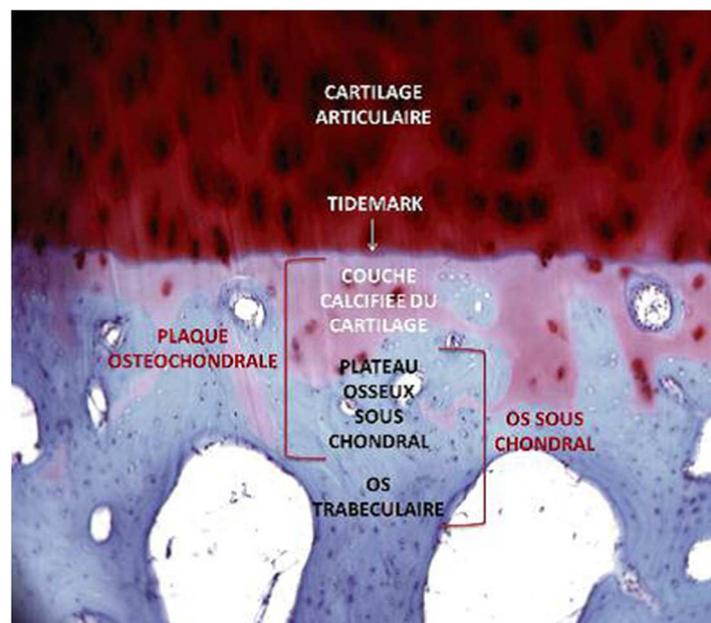


Figure 7. Coupe histologique de cartilage articulaire et d'os. Grossissement 10x. Issu de Henrotin et al., 2012 [31].

Les fonctions principales de l'os sous-chondral sont, d'une part, de servir de support au cartilage sus-jacent, et d'autre part, d'absorber les contraintes mécaniques exercées sur l'articulation [32]. Par ailleurs, il assure une partie des apports nutritifs du cartilage. En effet, les vaisseaux sanguins terminaux au niveau du plateau sous-chondral sont en contact direct avec la zone profonde du cartilage [33]. Cette organisation délivre au cartilage 50 % de ses besoins en oxygène et en glucose [32].

2.1.4 La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche vascularisé qui tapisse la face interne de la cavité articulaire à l'exception du cartilage, des ménisques et des ligaments croisés. Elle s'insère à la frontière entre l'os et le cartilage et délimite par conséquent la cavité articulaire. Elle est bordée à l'extérieur par la capsule articulaire et les formations ligamentaires. Elle forme des replis, principalement dans les zones où les influences mécaniques sont les plus restreintes. Par ailleurs, elle sécrète le liquide synovial à l'intérieur de la cavité articulaire [30].

La membrane synoviale se compose de deux couches distinctes, l'*intima* et la *subintima*, différenciées par leurs compositions cellulaires. Ces deux strates sont séparées de la capsule par un tissu conjonctif fibro-graisseux contenant peu de cellules, la subsynoviale. Néanmoins, la démarcation entre ces différentes couches n'est pas toujours très nette.

L'*intima* est la couche en contact avec la cavité articulaire. Elle est formée par une ou deux rangées de cellules. Son épaisseur varie entre 20 et 40 μm . En microscopie électronique, deux types de cellules se distinguent : les synoviocytes de type A et les synoviocytes de type B (Figure 8) [34].

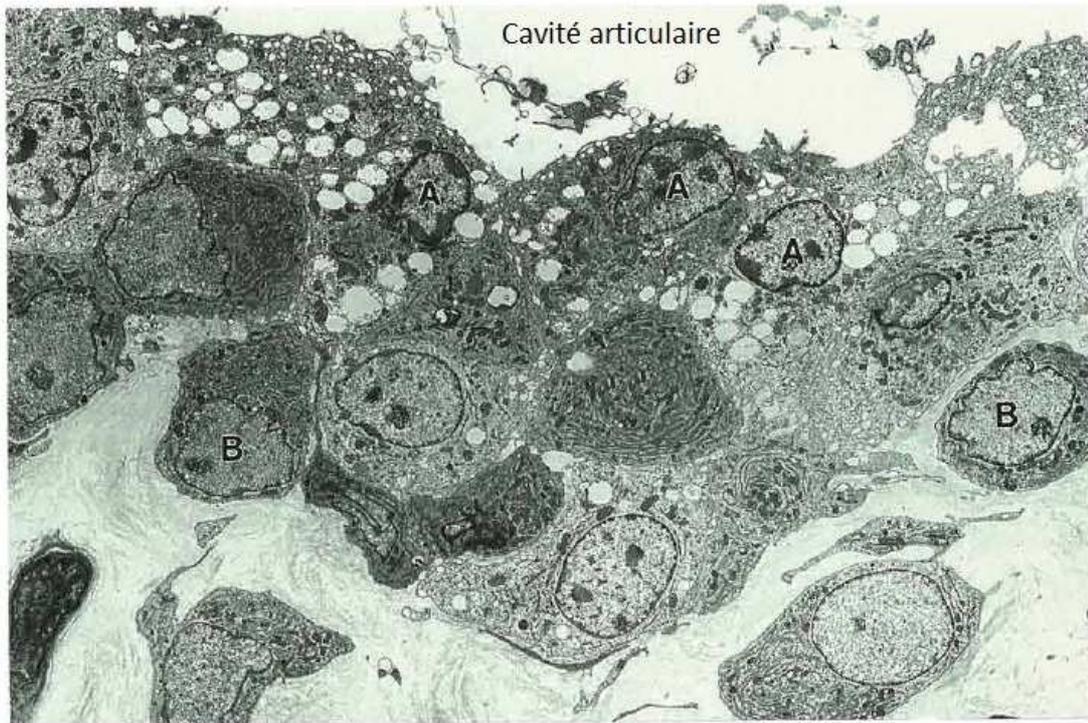


Figure 8. Photographie de l'ultrastructure des deux types de synoviocytes de l'intima d'une membrane synoviale de rat. Adapté d'après Iwanaga et al., 2000 [34]. A=synoviocytes de type A ; B=synoviocytes de type B.

Les synoviocytes de type A sont les plus nombreux. Ils se situent principalement en surface, proches de la cavité articulaire. Ils possèdent des propriétés communes avec les macrophages : appareil de Golgi développé, présence de lysosomes et de vésicules de pinocytose. En effet, ces synoviocytes ont la capacité d'endocyter, de résorber des débris et de dégrader des micro-organismes présents dans le liquide synovial. Ils permettent d'épurer le liquide synovial et de maintenir un environnement intra-articulaire aseptique [35, 36].

Les synoviocytes de type B sont moins nombreux, mais plus volumineux. Ils se distribuent de manière plus homogène dans l'intima. Ils possèdent un réticulum endoplasmique très développé. En effet, ils présentent une importante activité de synthèse et de sécrétion des constituants du liquide synovial dont la fibronectine, les collagènes et l'AH. Ce dernier est un muco-polysaccharide de haut poids moléculaire constitué d'une longue chaîne formée d'unités disaccharidiques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétylglucosamine (Figure 9). L'AH contribue à la lubrification de l'articulation [34, 37].

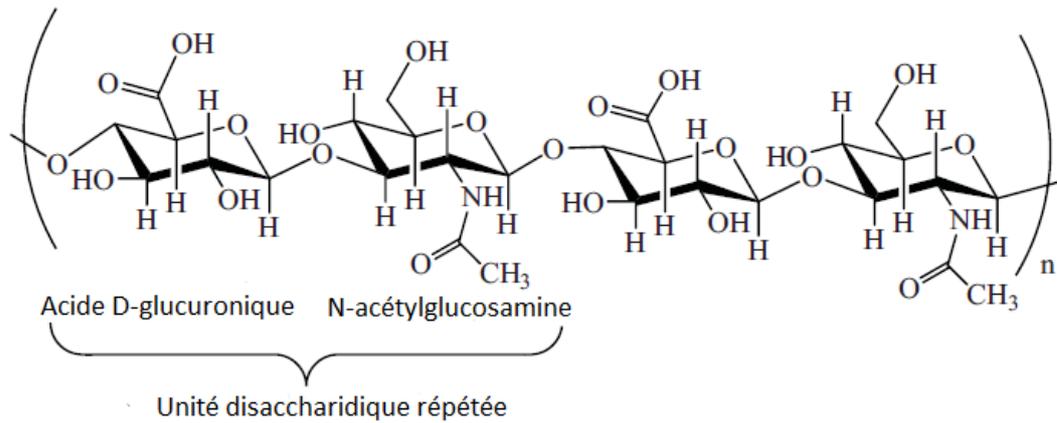


Figure 9. Structure chimique de l'acide hyaluronique. Adapté d'après Khan et al., 2013 [38].

La *subintima* est la couche avoisinant la capsule articulaire. Elle est riche en cellules (fibroblastes, histiocytes, mastocytes) et en fibres de collagène. En outre, elle est beaucoup plus vascularisée que l'*intima*. Elle contient des artérioles, des vaisseaux lymphatiques et, dans sa partie la plus superficielle, de très nombreux capillaires qui permettent un réel échange entre le sang et la cavité articulaire [34]. Les nutriments diffusent des capillaires synoviaux vers le liquide synovial avant d'atteindre la matrice extracellulaire du cartilage [1, 10, 39].

2.1.5 Le liquide synovial

Le liquide synovial est visqueux, clair et de couleur ambrée. C'est un dialysat du plasma auquel manquent les protéines de poids moléculaire élevé. Le volume prélevé dans l'articulation d'un genou sain est inférieur à 3,5 ml [40]. Le liquide synovial est un lubrifiant pour l'articulation. Il diminue les forces de friction appliquées à la surface du cartilage. Le liquide synovial est caractérisé par la présence de deux molécules : l'AH et la lubricine [41]. La lubricine confère au liquide synovial son caractère lubrifiant. L'AH contribue aux propriétés viscoélastiques du liquide synovial, qui dépendent de la concentration, du poids moléculaire et de la conformation de celui-ci [42]. Par ailleurs, et en raison du caractère avasculaire du cartilage, le liquide synovial assure des fonctions métaboliques. Il facilite le transport des éléments nutritifs et d'autres molécules solubles telles que des facteurs de croissance et des cytokines [1, 43].

2.1.5.1 Composition

La composition en protéines du liquide synovial sain est très proche de celle du plasma. Cependant, une sélection s'opère via la barrière synoviale qui autorise uniquement le passage des protéines de petite taille. Les protéines présentes dans le fluide synovial reflètent donc les propriétés de filtration de la membrane synoviale.

L'albumine est la protéine la plus abondante quantitativement, suivie par les globines α et β . Une très faible quantité de protéines de poids moléculaire plus élevé, comme le fibrinogène, est également présente [44]. L'AH, synthétisé par les synoviocytes, se retrouve dans le liquide synovial sous la forme d'une chaîne de disaccharides avec un poids moléculaire moyen compris entre 6 et 7 MDa [45]. Il contribue à la viscosité du fluide synovial. La lubricine est une glycoprotéine du liquide synovial synthétisée par les synoviocytes, par les chondrocytes et par les fibroblastes des ménisques et des ligaments croisés. Sa présence est primordiale pour assurer la lubrification au niveau des couches superficielles du cartilage articulaire et diminuer les frictions entre les surfaces cartilagineuses [27].

Des facteurs de croissance et des cytokines pro ou anti-inflammatoires sont présents dans le liquide synovial et ciblent autant les synoviocytes que les chondrocytes. Ces médiateurs peuvent soit être produits ou sécrétés par les synoviocytes, les chondrocytes ou par d'autres cellules constitutives des différents tissus de l'articulation, soit être dérivés du plasma [43, 46].

Le fluide synovial sain contient peu de cellules. Moins de deux cents leucocytes par mm^3 et aucun érythrocyte n'y est comptabilisé. Par ailleurs, le fluide synovial contient des cellules souches mésenchymateuses, qui ont des similarités avec les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse [47, 48].

2.2 L'arthrose

2.2.1 Définition et prévalence

L'Organisation Mondiale de la Santé définit l'arthrose comme étant « *la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être provoqué par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques ou traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral associée à la formation d'ostéophytes et de géodes. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale* » [49]. Plus récemment, l'Osteoarthritis Research Society International (OARSI) a actualisé cette définition en tenant compte des découvertes récentes « *l'arthrose est une affection des articulations mobiles caractérisée par un "stress" cellulaire et la dégradation de la matrice extracellulaire initiée par des "micro" ou "macro" lésions qui activent des réponses inadaptées de réparation dont les voies pro-inflammatoires de la réponse immunitaire naturelle non-spécifique. La maladie se manifeste d'abord par un dérangement moléculaire (métabolisme du tissu articulaire anormal), suivi par des modifications anatomiques (la dégradation du cartilage, le remodelage de l'os, la formation d'ostéophytes, l'inflammation des articulations et la perte de la fonction articulaire normale), qui peuvent aboutir à une maladie* » [50].

L'arthrose est une maladie musculo-squelettique douloureuse qui entraîne une dégradation du cartilage, une sclérose de l'os sous-chondral et une inflammation synoviale. L'arthrose affecte l'ensemble des tissus articulaires et péri-articulaires. Elle est donc associée à une hyper laxité ligamentaire, des tendinopathies et de la sarcopénie [51, 52]. Elle peut impliquer chez certains patients de la kinésiophobie, c'est-à-dire une peur persistante et intense provoquée par la simple pensée d'avoir à effectuer certains mouvements considérés comme pouvant induire ou augmenter la douleur [53]. Cela peut même conduire à de l'anxiété ou de la dépression, induisant

une sédentarité et, par-là, un déconditionnement physique. L'arthrose participe à l'inflammation systémique et chronique de bas grade associée au vieillissement et récemment nommée « inflammaging » [54]. La méta-inflammation est l'état inflammatoire chronique de bas grade, sans infection, qui accompagne le syndrome métabolique [55]. Ce syndrome désigne l'association de plusieurs facteurs de risque du diabète de type II et des maladies cardiovasculaires dont une dyslipidémie, une glycémie élevée, une hypertension et une obésité abdominale [56]. Chez le patient obèse, le tissu adipeux contribue à l'inflammation systémique de bas bruit et à la dégradation du cartilage en libérant dans la circulation sanguine des cytokines pro-inflammatoires et pro-cataboliques via des adipokines comme la leptine, l'adiponectine, la résistine et la visfatine [57-60]. L'association d'hypertension et de diabète chez un individu en surpoids augmente le risque d'arthrose des mains [61]. Le handicap causé par l'arthrose des membres est un facteur de risque de mortalité chez les patients atteints de pathologies cardio-vasculaires [62] (Figure 10).

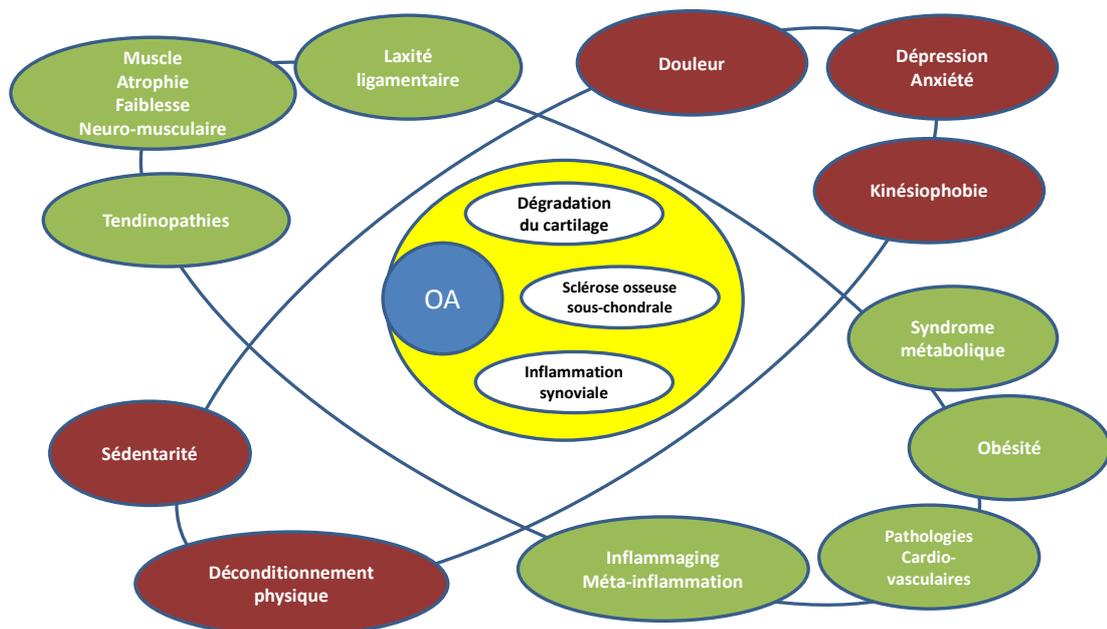


Figure 10. Représentation planétaire de l'arthrose selon Y. Henrotin (2016).

Au niveau mondial, en 2009, le nombre de personnes atteintes d'arthrose était estimé à 75,8 millions et, selon les prévisions, il devrait atteindre 82 millions en 2016 (<http://healthcare.globaldata.com>). En France, l'arthrose de la hanche (coxarthrose) et du genou (gonarthrose) touchent respectivement 1,9 % et 4,7 % des hommes et 2,5 % et 6,6 % des femmes [63]. Dans une enquête réalisée par le Service

Public Fédéral Santé Publique belge en 2008, 8,4 % des hommes et 16,8 % des femmes déclaraient avoir souffert d'arthrose au cours des douze derniers mois. Chez les personnes de 65 ans ou plus, la prévalence était plus élevée. En effet, 27,3 % des hommes déclaraient avoir souffert d'arthrose au cours des douze derniers mois. Chez les femmes de 65 ans et plus, l'arthrose était la pathologie chronique la plus souvent rapportée : une femme sur deux (50,2 %) de cette catégorie d'âge était concernée. Le pourcentage de personnes souffrant d'arthrose était significativement lié à l'âge et touchait 42,6 % des personnes âgées de 75 ans et plus (Figure 11) [64].

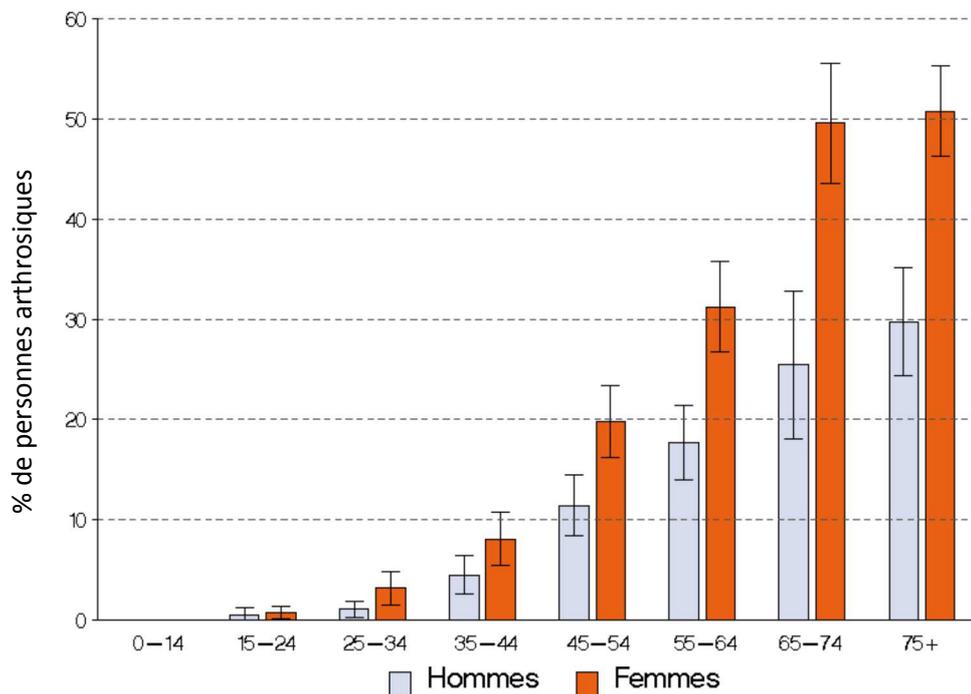


Figure 11. Pourcentage de la population souffrant d'arthrose, selon le sexe et l'âge, en Belgique [64]. Le pourcentage de personnes arthrosiques augmente avec l'âge. Pour une même tranche d'âge, le pourcentage de femmes atteintes d'arthrose est plus important que le pourcentage d'hommes arthrosiques.

La prévalence et l'incidence de l'arthrose chez l'humain sont grandes, augmentent avec l'âge et sont plus élevées chez la femme que chez l'homme.

2.2.2 Facteurs de risque

L'arthrose est une pathologie d'étiologie multifactorielle incluant des facteurs génétiques et environnementaux. Les facteurs de risque de l'arthrose chez l'homme sont [65] :

- l'âge. La prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge [64] ;

- le sexe. Les femmes sont associées à une prévalence plus grande de développer une arthrose sévère. Ce statut est lié aux changements hormonaux apparaissant au cours de la ménopause [66]. En effet, les œstrogènes, dont la production est arrêtée lors de la ménopause, ont une activité anti-inflammatoire et anti-nociceptive [67] ;
- l'origine ethnique. Les Afro-américains présentent une prévalence plus élevée de développer une coxarthrose que les Caucasiens [68] ;
- les facteurs génétiques. Un certain nombre d'allèles à risque ont été identifiés, tels que le gène codant pour GDF5 (*growth differentiation factor 5*), polymorphisme rs143383, et le gène codant pour SMAD3 (*mothers against decapentaplegic homologue 3*), polymorphisme rs12901499. Les mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) influencent également la prévalence de l'arthrose [69] ;
- les anomalies morphologiques (par exemple longueurs de jambes inégales, dysplasies) ;
- l'obésité. Elle est un facteur de risque important dans le développement de la coxarthrose, la gonarthrose et l'arthrose digitale [70, 71]. L'obésité est un facteur de risque d'incidence et de progression de l'arthrose. Chez les patients obèses, les contraintes mécaniques exercées sur les articulations portantes sont plus élevées. Par ailleurs, le tissu adipeux, présent en quantité anormalement élevée, produit des quantités plus importantes de médiateurs solubles tels que des cytokines pro-inflammatoires et des adipokines (leptine, adiponectine, résistine et visfatine) qui interviennent dans le développement de l'arthrose [58, 72]. L'hypoxie régnant dans certaines parties de la masse graisseuse nouvellement synthétisée est également responsable de la libération accrue des cytokines pro-inflammatoires [73]. En effet, l'association entre l'obésité et la survenue d'arthrose au niveau des doigts suggère un lien systémique (via les adipokines et les cytokines pro-inflammatoires) entre ces deux conditions [74] ;

- les microtraumatismes répétés liés aux activités physiques et professionnelles ;
- les traumatismes ostéo-articulaires ;
- la méniscectomie et l'immobilisation ;
- la pratique intensive de certains sports.

2.2.3 Modifications anatomo-pathologiques

L'arthrose touche tous les tissus composant l'articulation synoviale. Des modifications anatomo-pathologiques particulières sont observées au niveau du cartilage, de l'os sous-chondral, de la membrane synoviale et du liquide synovial.

2.2.3.1 Au niveau du cartilage articulaire

Lors du développement d'arthrose, le cartilage articulaire est le siège d'un déséquilibre entre les contraintes mécaniques qui lui sont appliquées et sa capacité de résistance envers ces forces. Ce déséquilibre peut survenir lorsque le cartilage articulaire sain est exposé à des contraintes mécaniques anormales ou lorsque les contraintes sont appliquées sur un cartilage déjà fragilisé par la perte de ses propriétés de résistance [75].

Au niveau macroscopique, le cartilage articulaire, qui possède en conditions normales un aspect blanc, lisse, brillant et légèrement translucide, devient jaunâtre et plus opaque. De plus, une variété de changements structurels est observée. La surface cartilagineuse devient rugueuse (aspect « chair de crabe »). La rugosité du cartilage est le reflet de la présence de fibrillations et de fissures. Au stade ultime de la maladie, le cartilage disparaît, laissant apparaître l'os sous-chondral (Figure 12).

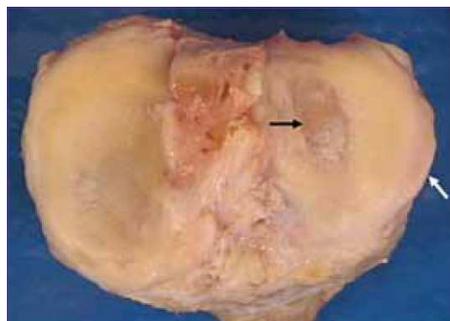


Figure 12. Photographie d'un plateau tibial arthrosique. La flèche noire montre une zone avec perte totale du cartilage articulaire, exposant l'os sous-chondral. La flèche blanche indique un ostéophyte en formation. Issu de Salter et al., 2010 [76].

Au niveau microscopique, une perte des PG du cartilage est observée. Cette perte des PG est observée grâce à la perte de l'intensité rouge de la coloration à la safranine-O de la matrice extracellulaire cartilagineuse (Figure 13A). La perte des PG s'observe d'abord dans la zone superficielle du cartilage. Au décours de la maladie, elle s'étend aux zones plus profondes. Les fibrillations sont d'abord caractérisées par des discontinuités de surface, sans perte de la matrice. Elles sont parallèles et/ou tangentielles à la surface et localisées d'abord au niveau de la zone supérieure du cartilage articulaire (Figure 13B). Au fur et à mesure de la progression de la pathologie, ces fibrillations s'étendent vers les couches profondes du cartilage et deviennent des fissures (Figure 13C). Celles-ci peuvent être uniques ou ramifiées. Finalement, le tissu cartilagineux disparaît (Figure 13D) sur une surface plus ou moins grande laissant l'os sous-chondral apparent (Figure 13E). Une autre particularité du cartilage arthrosique est la duplication ou multiplication de la « *tidemark* » (Figure 13D). Le front de minéralisation migre vers la surface provoquant un épaissement de la couche calcifiée du cartilage. La « *tidemark* » est traversée par de petits capillaires sanguins provenant de l'os sous-chondral [77]. En outre, des terminaisons nerveuses sensibles et sympathiques franchissent la « *tidemark* » [78]. Concernant la cellularité du cartilage, il est admis que l'arthrose résulte d'un déséquilibre métabolique causé par les tentatives de réparation initiées par les cellules en réponse aux processus de dégradation tissulaire [79]. En effet, dans les stades précoces de la maladie, une hypercellularité s'identifie par la présence d'agrégats de chondrocytes, des clones (Figures 13C et 13D). Ensuite, dans les formes sévères d'arthrose, le nombre de chondrocytes diminue consécutivement à l'apoptose et à la nécrose des cellules [80, 81].

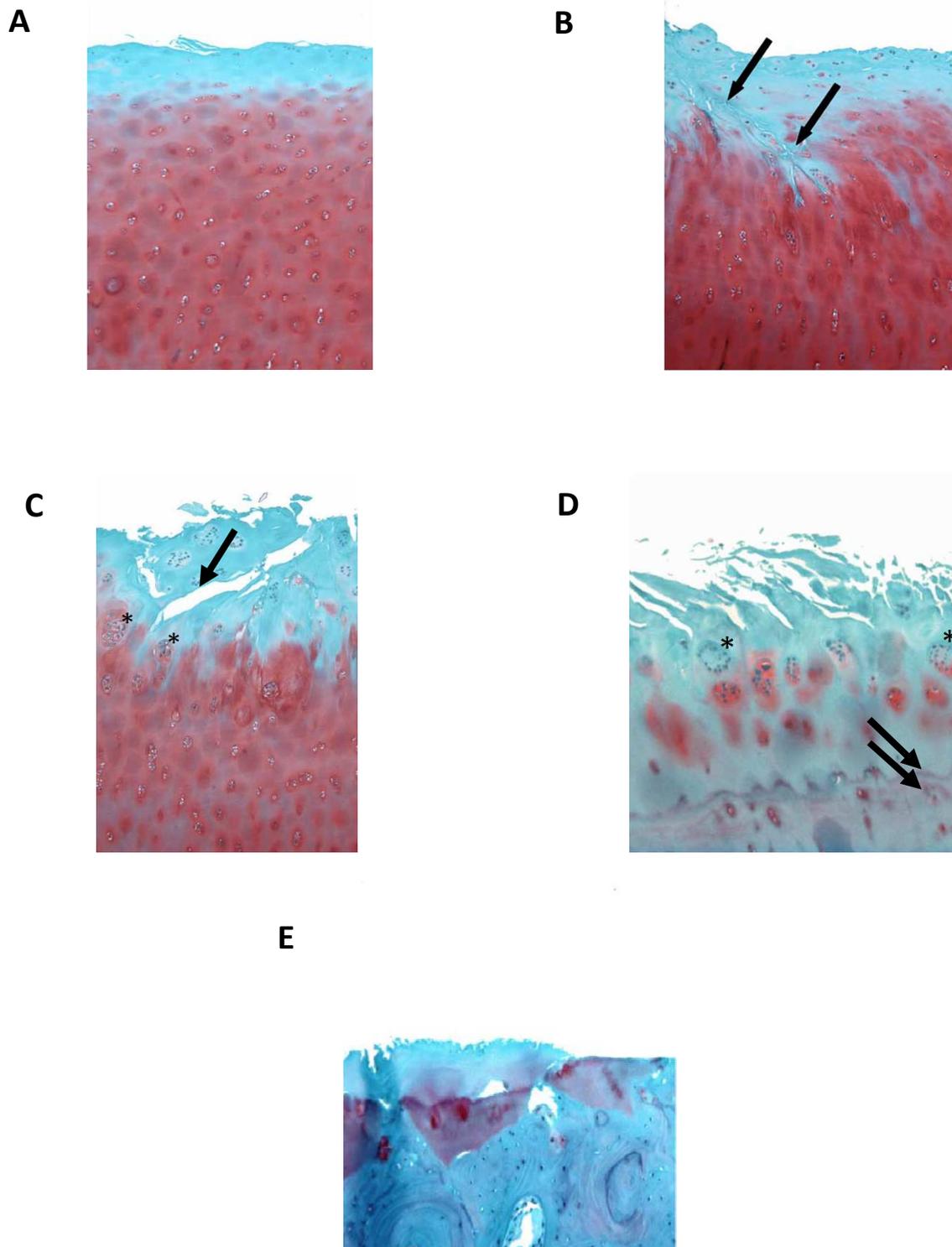


Figure 13. Coupes histologiques représentatives des diverses altérations du cartilage arthrosique [82]. A : perte du contenu en protéoglycanes. B : les flèches noires montrent les fibrillations. C : la flèche noire montre l'apparition des fissures, les étoiles indiquent les clones. D : érosion, la flèche noire montre la « *tidemark* », les étoiles indiquent les clones. E : dénudation, seul l'os sous-chondral est visible. Issues de Pritzker et al., 2006 [82].

2.2.3.2 Au niveau de l'os sous-chondral

Le cartilage articulaire interagit avec l'os sous-chondral pour assurer le maintien de l'intégrité articulaire. Cependant, l'os sous-chondral joue un rôle capital dans la pathogenèse de l'arthrose [83]. En effet, les ostéoblastes de l'os sous-chondral, lorsqu'ils sont soumis à des contraintes mécaniques répétées et de forte intensité, expriment un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique contribuant aux changements structuraux observables dans l'os sous-chondral arthrosique [84] (Figure 14).

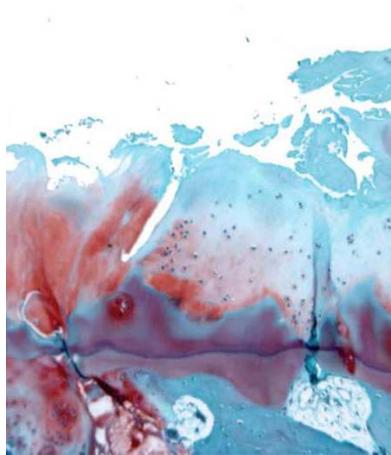


Figure 14. Photographie d'une coupe histologique représentant le remodelage de l'os sous-chondral lors du processus arthrosique. Issue de Pritzker et al., 2006 [82].

Dans les stades précoces d'arthrose, un remodelage accru et une résorption de l'os sous-chondral sont observés [85]. L'os sous-chondral montre une porosité amplifiée [86]. Ensuite, avec la progression de l'arthrose, l'épaisseur du plateau osseux sous-chondral augmente. Ce phénomène est la sclérose de l'os sous-chondral, caractérisée par une accumulation de substance ostéoïde [87]. Malgré cette augmentation de volume osseux et l'épaississement des travées osseuses, l'os sous-chondral est hypominéralisé et moins rigide [88]. Les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral expriment un phénotype particulier, différent de celui des ostéoblastes des zones non-sclérosées voisines. Ce phénotype est caractérisé par une synthèse anormalement élevée de collagène de type I, d'ostéocalcine, d'ostéopontine, de *progressive ankylosis protein homolog* (ANKH) et de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines (IL)-6 et -8 [89]. Des excroissances osseuses recouvertes de fibrocartilage, appelées ostéophytes,

apparaissent aux extrémités de l'articulation. Les ostéophytes proviennent du périoste [90]. Le degré d'ossification et la proportion de tissu conjonctif mésenchymateux varient selon les ostéophytes [91]. Les ostéophytes sont visibles en radiographie et parfois macroscopiquement (Figure 12) [92]. Des lésions semblables à des œdèmes sont observables en résonance magnétique nucléaire au niveau de la moelle osseuse et de l'os trabéculaire [93]. Ces lésions sont fortement associées à de la douleur chez le patient arthrosique [94, 95]. Notons aussi l'apparition de kystes intra-osseux à contenu liquidien fibreux ou nécrotique [96]. Au niveau du genou arthrosique, ces lésions sont observables en regard des lésions cartilagineuses, dans les régions où les contraintes mécaniques sont les plus importantes. Au contraire, du côté opposé, une ostéopénie est souvent observée [97].

2.2.3.3 Au niveau de la membrane synoviale

La membrane synoviale arthrosique est le siège d'une inflammation appelée synovite. La synovite est secondaire à la dégradation du cartilage. Elle s'amorce en regard des lésions cartilagineuses pour ensuite s'étendre à toute la membrane synoviale.

Les modifications caractéristiques observables histologiquement dans la membrane synoviale enflammée sont une hypertrophie des franges synoviales (replis flottant dans la cavité articulaire), une hyperplasie et une hyperémie. La membrane synoviale apparaît également épaissie et fibreuse [98]. La membrane synoviale normalement plane prend une architecture villositaire ou papillaire. L'*intima* est hypertrophiée à cause de l'augmentation du nombre de synoviocytes et plus particulièrement de synoviocytes de type A. Ceux-ci se disposent en couches multiples jouxtant un tissu épaissi par un dépôt fibreux. La fibrose de la synoviale est en effet un processus commun, souvent observé dans les étapes tardives de l'arthrose [99, 100]. Une augmentation de la densité vasculaire et un infiltrat cellulaire sont parfois observés au niveau de la *subintima*. Un infiltrat de cellules mononucléées (monocytes/macrophages, lymphocytes T, lymphocytes B) se retrouve dans la *subintima* [101]. Des fragments de débris articulaires (cartilage ou os) peuvent se déposer dans la membrane synoviale et par conséquent provoquer une réponse inflammatoire à corps étranger. Même si l'inflammation de la

membrane synoviale est généralement plus importante dans les formes sévères d'arthrose, elle peut aussi être observée dans les stades précoces de la progression de la maladie [102]. L'inflammation de la membrane synoviale entraîne une altération de ses propriétés de filtration.

2.2.3.4 Au niveau du liquide synovial

Lors du développement de l'arthrose, la composition et les propriétés du liquide synovial sont modifiées, en raison du remaniement du métabolisme des cellules et de la structure des tissus de l'articulation. La qualité du liquide est par conséquent affectée. En effet, ses propriétés viscoélastiques sont amoindries. Dans ce contexte, son rôle de lubrification et d'amortisseur de chocs est fortement perturbé, entraînant une accélération du processus d'érosion mécanique.

L'inflammation provoque une hausse du contenu en protéines du liquide synovial. Étant donné la modification des propriétés de filtration de la membrane synoviale lors du processus arthrosique, des protéines plasmatiques de haut poids moléculaire, comme le fibrinogène, arrivent à franchir la barrière et se retrouvent dans le liquide synovial en quantité anormalement élevée [44]. La concentration des cytokines et des métalloprotéases matricielles (MMP) est aussi augmentée [103] alors que la concentration en AH est diminuée. L'AH est dégradé par les formes activées de l'oxygène et les hyaluronidases [104, 105]. Le terme hyaluronidase décrit les enzymes qui dégradent l'AH. Il existe des centaines d'hyaluronidases, classées en deux groupes selon leur séquence en acides aminés : les hyaluronidases des eucaryotes et des procaryotes. Chez l'humain, il existe six hyaluronidases distinctes. C'est principalement l'hyaluronidase-2 qui est présente au niveau des articulations [106]. Les produits de dégradation de l'AH, de plus petites tailles, exercent des activités biologiques différentes des chaînes natives de haut poids moléculaire. En effet, les molécules d'AH composées de chaînes incluant 25 à 50 disaccharides ont une activité pro-inflammatoire, immunogène et angiogénique [107, 108] (Tableau 1).

Tableau 1. Variation des propriétés et de la composition du liquide synovial chez un individu sain et arthrosique [30].

Propriétés et composition du liquide synovial	Individu sain	Individu arthrosique	Variation
Volume (ml)	0,5 à 2	> 3,5	↗
Acide hyaluronique (AH) (mg/ml)	2 à 4	< 2	↘
Poids moléculaire de l'AH (MDa)	4 à 7	< 4	↘
Lubricine (mg/L)	0,24	0,15	↘
Protéines totales (mg/L)	19 à 28	28 à 60	↗
Leucocytes (/mm ³)	< 200	< 2000	↗
Neutrophiles (% de leucocytes)	10	> 25	↗
Module d'élasticité (Pa à 2,5 Hz)	± 100	± 8	↘
Module de viscosité (Pa à 2,5 Hz)	± 45	± 5	↘
Viscosité au repos (Pa.sec)	2 à 40	0,1 à 1	↘

2.2.4 Physiopathologie de l'arthrose

L'arthrose résulte d'un déséquilibre entre les phénomènes de dégradation et les tentatives de réparation. Le chondrocyte occupe une position centrale dans les mécanismes physiopathologiques de la pathologie [109]. Les principales modifications biologiques responsables du développement de l'arthrose sont décrites dans trois boucles pathologiques qui impliquent l'activité de facteurs biochimiques au sein du cartilage, de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral. Ce sont les boucles cartilago-cartilagineuse, ostéo-cartilagineuse et synovio-cartilagineuse (Figure 15).

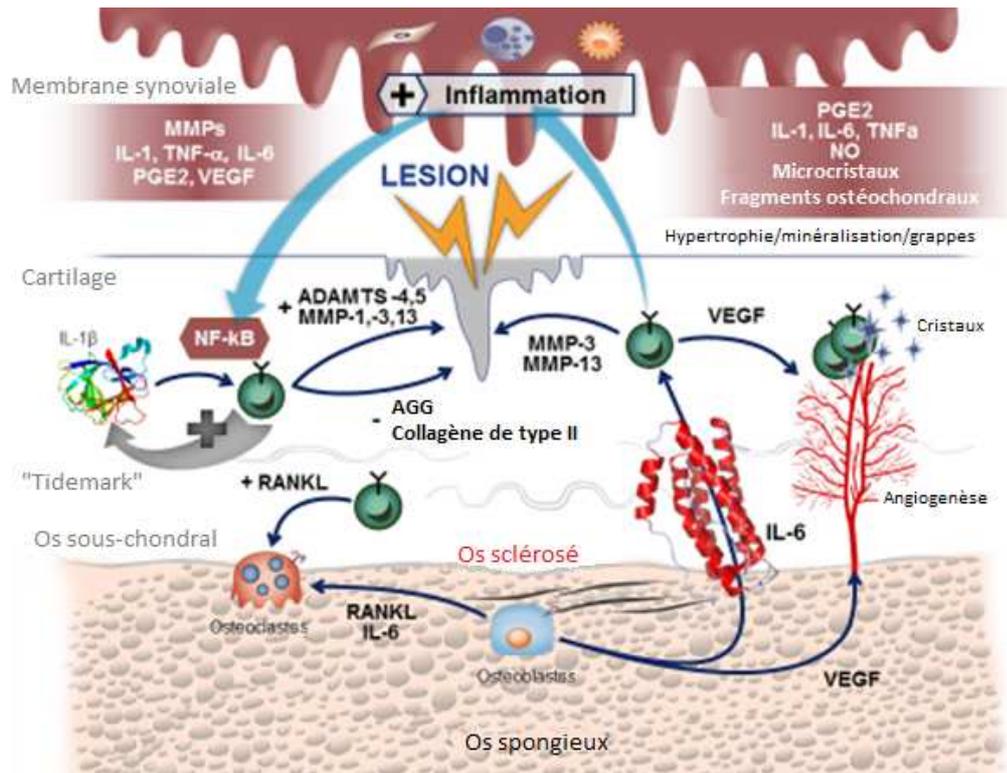


Figure 15. Représentation des boucles cartilagineuse, ostéo-cartilagineuse et synovio-cartilagineuse selon Y. Henrotin (2016). ADAMTS=a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs ; AGG=agrécane ; IL=interleukine ; MMP= métalloprotéase matricielle ; NF-κB=nuclear factor κB ; NO=oxyde nitrique ; TNF=tumor necrosis factor ; PGE₂=prostaglandine E₂ ; RANKL=receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ; VEGF=vascular endothelial growth factor.

2.2.4.1 Boucle cartilagineuse

D'un point de vue métabolique, les chondrocytes arthrosiques peuvent exprimer des phénotypes différents selon leur localisation et l'évolution de la pathologie. À la suite d'une contrainte mécanique anormale, le chondrocyte réagit en se divisant et en augmentant son métabolisme de base, la synthèse des facteurs de croissance et le renouvellement des composants matriciels (comme les PG de petite taille). C'est le phénotype dit « anabolique ». Cette hyperactivité est limitée aux chondrocytes des zones moyennes et profondes du cartilage arthrosique [110] et est observée au stade précoce de la maladie [111]. Cette phase est interprétée comme une tentative des chondrocytes à réparer les lésions initiales de la matrice.

Une réponse catabolique s'ajoute ensuite dans les stades plus avancés de la maladie via l'augmentation de la production des enzymes protéolytiques par les chondrocytes. C'est le phénotype « catabolique », caractérisé par la synthèse accrue de MMP et, par conséquent, par la dégradation de la matrice extracellulaire [111].

Les chondrocytes activés libèrent également des cytokines. Parmi ces cytokines, l'IL-1 β joue un rôle critique en activant la voie de signalisation *nuclear factor* (NF)- κ B. L'IL-1 β stimule, de manière autocrine et paracrine, la production par les chondrocytes de MMP et de radicaux libres, qui accentuent encore la dégradation de la matrice extracellulaire. C'est la boucle cartilagino-cartilagineuse (Figure 15).

La prolifération excessive des chondrocytes aboutit à la formation de grappes cellulaires et à leur différenciation hypertrophique. Les grappes de chondrocytes peuvent se composer de plus de vingt cellules. Elles sont souvent localisées à proximité des fissures de la couche supérieure du cartilage. La dégradation de la matrice extracellulaire pourrait favoriser la différenciation des chondrocytes [112]. Ce phénotype « hypertrophique » des chondrocytes est caractérisé par la synthèse de phosphatase alcaline (PA) tissu non spécifique, d'ostéocalcine, de collagène de type X [113, 114], de *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) [115], d'annexines [116] et de molécules de la minéralisation [117]. Cette différenciation hypertrophique s'accompagne d'une minéralisation de la matrice extracellulaire, d'un épaissement de la couche calcifiée du cartilage, de la multiplication de la *tidemark* et de l'invasion du cartilage par des vaisseaux sanguins. C'est le phénomène d'ossification endochondrale responsable de l'augmentation de la rigidité du cartilage. La différenciation terminale des chondrocytes, caractérisée par l'expression de gènes tels que le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), le syndecan-3, la PA et l'annexine VI, aboutit à leur apoptose [109].

2.2.4.2 Boucle ostéo-cartilagineuse

La sclérose de l'os sous-chondral caractéristique du remodelage osseux qui se produit dans l'arthrose pourrait, selon les différentes théories, être causée par les microfractures observables au niveau de la jonction ostéochondrale arthrosique [118] ou être la conséquence d'un trouble métabolique général de l'os [119, 120]. Certaines études laissent croire que les modifications de l'os sous-chondral précèdent celles du cartilage et d'autres suggèrent que la sclérose sous-chondrale est la conséquence de l'altération des propriétés mécaniques du cartilage. L'attribution du phénomène déclencheur reste controversée [121].

La découverte de l'existence de structures permettant la communication biochimique entre l'os et le cartilage suggère un rôle de l'unité biomécanique os-cartilage dans le développement et l'évolution de l'arthrose [122]. Les connexions entre l'os sous-chondral et le cartilage (microfractures, canaux vasculaires, vaisseaux sanguins) permettent la diffusion de médiateurs entre ces deux tissus. Les chondrocytes arthrosiques produisent notamment le *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) qui est diffusé vers l'os. Ce ligand est impliqué dans les changements structurels de l'os sous-chondral en stimulant l'ostéoclastogenèse [123]. En utilisant un modèle de co-culture ostéoblastes/chondrocytes, nous avons montré que les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral arthrosique, contrairement aux ostéoblastes des zones non-sclérosées, diminuaient la synthèse d'AGG et de collagène de type II et augmentaient l'expression des MMP-3 et -13 par les chondrocytes. Le médiateur responsable de ces effets semble être l'IL-6 [124]. En effet, lors de contraintes mécaniques, les ostéoblastes produisent de l'IL-6 et du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [84, 125, 126]. VEGF stimule l'angiogenèse. Ceci suggère que des facteurs provenant de l'os sous-chondral contribuent à la dégradation du cartilage. Il existe donc un cercle vicieux entre le cartilage et l'os sous-chondral, c'est la boucle ostéo-cartilagineuse (Figure 15).

2.2.4.3 Boucle synovio-cartilagineuse

La membrane synoviale arthrosique est le siège d'une inflammation qui contribue au gonflement et à la rigidité articulaires. Cette réaction inflammatoire est causée par la libération des fragments ostéochondraux et des débris peptidiques issus de la dégradation des composants matriciels du cartilage [127]. De plus, des cytokines produites par les chondrocytes arthrosiques stimulent la production de facteurs cataboliques et inflammatoires par les synoviocytes et les cellules de la réaction inflammatoire de la membrane synoviale. Ces médiateurs agissent à leur tour en s'attaquant à la couche superficielle du cartilage et en induisant la production accrue de facteurs cataboliques par les chondrocytes [98]. Par conséquent, la destruction du cartilage entretient l'inflammation de la membrane synoviale et inversement, ce qui conduit à la progression de l'arthrose, c'est la boucle synovio-cartilagineuse (Figure 15).

2.2.4.4 Les principaux médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'arthrose

2.2.4.4.1 Les enzymes protéolytiques

Les enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage sont principalement les MMP et les agrécanases. Ces enzymes sont produites en quantités anormalement élevées dans le cartilage et dans le fluide synovial des patients arthrosiques [128, 129].

La MMP-13, ou collagénase-3, est la principale enzyme dégradant le collagène de type II [130]. Elle est abondamment produite dans les conditions pathologiques au niveau des lésions cartilagineuses et son expression est stimulée par les médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et le *tumor necrosis factor* (TNF)- α [130, 131]. La MMP-1, ou collagénase-1, est également un contributeur majeur dans le clivage primaire du collagène de type II [132]. La libération d'MMP-1 par des explants de cartilage en culture est augmentée en présence du ligand à la chimiokine (motif C-C) (CCL)-20, alors que l'expression du collagène de type II est diminuée par cette cytokine [133]. La MMP-8, ou collagénase-2, intervient aussi dans le clivage du collagène de type II de la matrice cartilagineuse. La MMP-8 clive également le collagène de type I, présent dans l'os et dans les tendons [134].

Les stromélysines (stromélysine-1, -2, -3 ou respectivement MMP-3, -10, -11) et les gélatinases (MMP-2 et -9) interviennent aussi dans la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage. Les stromélysines sont impliquées dans le clivage des composés matriciels non collagéniques [135]. Les gélatinases dégradent le collagène dénaturé et les MMP membranaires [136].

La fonction principale des MMP membranaires (MMP-14, -15, -16 ou respectivement MT-1, -2, -3) est de participer à l'activation d'autres MMP [128].

Les MMP non-membranaires sont sécrétées sous une forme inactive par les chondrocytes ou par les synoviocytes. L'activation extracellulaire des pro-MMP est complexe et fait intervenir en cascade toute une série de sérines protéases, des MMP et des formes activées de l'oxygène [29]. La MMP-3 peut par exemple activer la

pro-MMP-1, pro-MMP-8 et pro-MMP-13, et, par-là, amplifier la dégradation du cartilage [137, 138].

Les MMP sont inhibées par des protéines spécifiques nommées inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) [139]. Dans le cartilage arthrosique, un déséquilibre entre la quantité de TIMP et de MMP s'installe progressivement, menant à un déficit en TIMP. Par conséquent, une augmentation de l'activité enzymatique de type métalloprotéase se produit [140].

Les agrécanases-1 et -2 sont également impliquées dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage. Elles sont nommées ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)-4 et -5. Elles dégradent l'AGG au niveau du domaine interglobulaire (G1-G2) NH₂ terminal (endroit différent du site de clivage de la MMP-3) et au niveau de quatre sites dans la région riche en CS de l'AGG [141-143] (Figure 4).

Des cathepsines, des calpaïnes et des hyaluronidases sont également engagées dans la dégradation du cartilage [144, 145].

2.2.4.4.2 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines et des glycoprotéines intervenant dans la communication intercellulaire. Au sein de l'articulation, elles sont principalement synthétisées par les chondrocytes, par les synoviocytes de type B et par les ostéoblastes de l'os sous-chondral. Le rôle que les cytokines pro-inflammatoires jouent dans la pathogenèse de l'arthrose est le résultat de leurs effets directs sur les cellules qui composent l'articulation et de l'impact via les voies de signalisation intra-cellulaire sur la production d'autres cytokines, d'autres composés inflammatoires et d'enzymes [146].

L'IL-1 β et le TNF ont été largement étudiés, car ils reproduisent *in vitro* le déséquilibre métabolique observé au niveau des chondrocytes arthrosiques. Ils induisent *in vitro* une libération de médiateurs pro-inflammatoires, de MMP, agrécanases et ils inhibent les synthèses de protéines matricielles [147].

L'IL-1 β devient active après clivage de la pro-IL-1 β par, notamment, l'enzyme caspase 1, qui induit sa libération dans l'espace extracellulaire [148]. L'IL-1 β peut

alors se lier sur son récepteur membranaire nommé IL-1R1 et activer le signal intra-cellulaire. L'IL-1 β entre en compétition avec son antagoniste IL-1Ra pour la liaison au récepteur IL-1R1 [149]. L'antagoniste IL-1Ra est donc capable de diminuer l'activité de l'IL-1 β [150]. Lorsque l'IL-1 β se lie à son autre récepteur nommé IL-1R2, il devient inactif et ne peut pas induire d'activité biologique. L'antagoniste IL-1Ra peut également se lier au récepteur IL-1R2 [151]. L'expression du récepteur IL-1R1 est augmentée à la surface des chondrocytes chez les patients arthrosiques [152]. La liaison de l'IL-1 β au récepteur IL-1R1 induit une cascade de signalisations menant finalement à l'activation des voies NF- κ B et *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Figure 16). L'activation de ces deux voies induit l'expression de facteurs de transcription résultant en la synthèse de cytokines, chimiokines, médiateurs inflammatoires et enzymes.

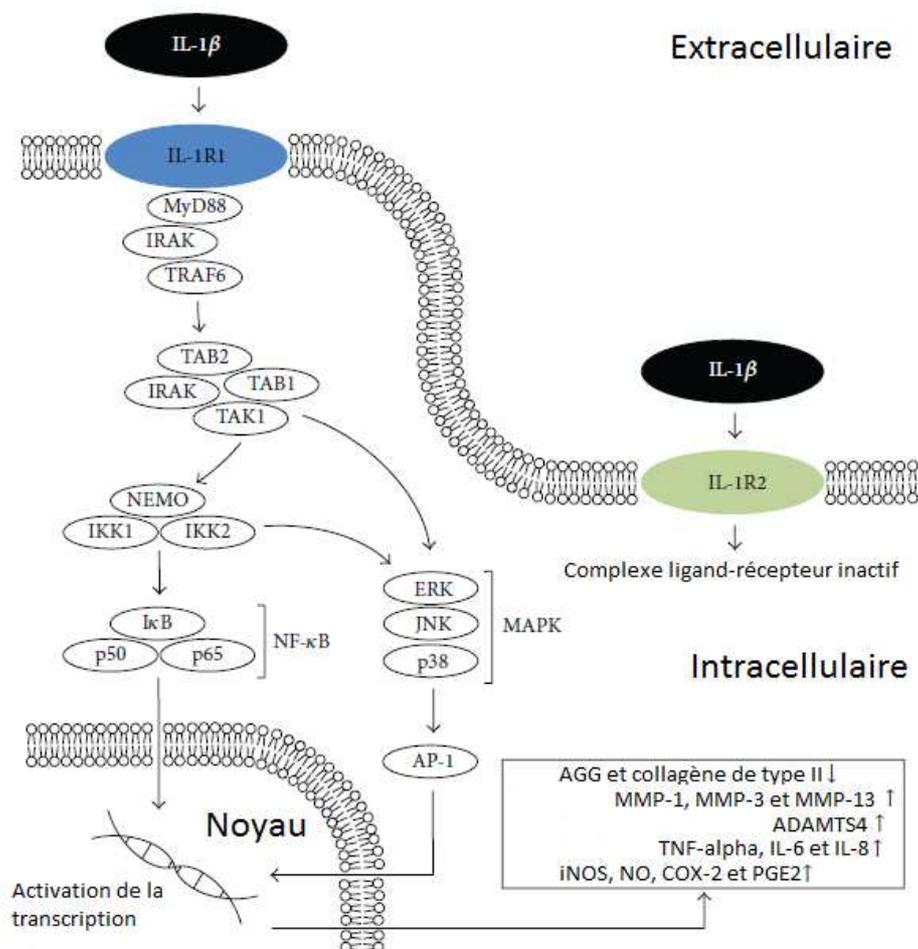


Figure 16. Voie de signalisation intra-cellulaire associée à l'IL-1 β et ses effets. IL-1R1=récepteur de l'interleukine-1, type 1 ; IL-1R2=récepteur de l'interleukine-1, type 2 ; p50 et p65=sous-unités formant la protéine NF- κ B ; I κ B=inhibiteur d'NF- κ B ; MAPK=*mitogen activated protein kinases*. Adapté d'après Wojdasiewicz et al., 2014 [146].

NF- κ B se compose de deux sous-unités, p50 et p65, qui résident dans le cytoplasme en formant un complexe inactif en association avec la sous-unité inhibitrice I κ B α . Quand la sous-unité I κ B α est phosphorylée, elle se dissocie du complexe. NF- κ B, en réponse à la phosphorylation de sa sous-unité p65, est transféré dans le noyau, où il induit la transcription de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, de la prolifération et de l'inflammation [153].

L'IL-1 β inhibe la synthèse des composants de la matrice extracellulaire tels que les AGG et le collagène de type II [154, 155]. Par contre, l'IL-1 β accroît la synthèse des MMP-1, MMP-3 et MMP-13 [156]. Par ailleurs, elle induit la production d'ADAMTS4 [157, 158]. En plus de l'inhibition de leur synthèse, la dégradation des composants matriciels est donc augmentée. L'IL-1 β crée également un déséquilibre important entre les enzymes et leurs inhibiteurs en défaveur de ces derniers. Une part de cette inhibition est causée par l'intermédiaire de l'oxyde nitrique (NO). Sa production, ainsi que celle de sa synthase (iNOS) sont stimulées par l'IL-1 β . L'action majeure du NO se traduit par l'apoptose des chondrocytes [159]. Les chondrocytes soumis à l'effet de l'IL-1 β vieillissent donc plus rapidement et meurent par apoptose [160]. En outre, la production d'IL-1Ra est inhibée par le NO, ce qui augmente en retour l'activité de l'IL-1 β [161, 162]. L'IL-1 β induit également la synthèse de la cyclooxygénase (COX) 2 et de la prostaglandine E₂ (PGE₂) [163]. Durant la progression de l'arthrose, l'IL-1 β stimule la production des espèces réactives de l'oxygène [146].

Le TNF- α , tout comme l'IL-1 β , est une cytokine inflammatoire impliquée dans les processus physiopathologiques de l'arthrose. Les effets du TNF- α sont semblables à ceux de l'IL-1 β . Le TNF- α et l'IL-1 β peuvent agir en synergie [46, 164].

L'IL-6 est également une cytokine importante dans la physiopathologie de l'arthrose. Elle agit en synergie avec l'IL-1 β sur le chondrocyte et est un médiateur central de la communication entre l'os et le cartilage. Par exemple, elle agit en synergie avec l'IL-1 β pour diminuer la production du collagène de type II et augmenter la synthèse des MMP [165]. De plus, elle régule le remodelage de l'os sous-chondral [124, 166]. Parmi les autres cytokines, citons l'IL-15 qui est associée à la sévérité de la douleur chez les patients arthrosiques [167]. Sa concentration est élevée dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrose à un stade précoce [168].

L'IL-17 inhibe la synthèse des PG et stimule la production des MMP [169]. Par ailleurs, elle influence la sécrétion d'autres cytokines telles que l'IL-1 β , TNF- α et IL-6 [170]. L'IL-17 favorise aussi la libération du VEGF et par conséquent le développement excessif de vaisseaux sanguins au niveau de la membrane synoviale, menant à son hypertrophie [171, 172]. Comme les autres cytokines, l'IL-18 stimule la synthèse des MMP et inhibe la production des AGG, PG et collagène de type II [173, 174]. L'IL-18 induit sur les chondrocytes des changements morphologiques typiques des cellules entrant en apoptose [175]. L'IL-8 est aussi associée à de l'inflammation et impliquée dans le processus de dégradation du cartilage.

Il existe également des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, capables de contrecarrer les effets de l'IL-1 β [146]. L'IL-4 inhibe l'apoptose des chondrocytes, en association avec l'IL-10 [176, 177]. L'IL-10 stimule la production de TIMP-1 [178]. Par ailleurs, l'IL-10 et l'IL-13 stimulent la synthèse de l'IL-1Ra [146, 178]. Par conséquent, la production des MMP est inhibée et la synthèse du collagène de type II et des AGG est augmentée. L'IL-13 diminue les synthèses de PGE₂ et de COX2 [179] (Figure 17).

2.2.4.4.3 Les formes activées de l'oxygène

En réponse à des variations de pression partielle en oxygène, à des stress mécaniques et à des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , des taux anormalement élevés d'espèces réactives de l'oxygène sont produits au niveau des articulations arthrosiques [180]. Ces formes actives de l'oxygène dont les radicaux peroxydes (anion superoxyde O₂⁻) et hydroxyle (\cdot OH) endommagent directement le cartilage articulaire. Du NO est également produit par iNOS. L'intensification de ce processus est par ailleurs associée à une expression diminuée des enzymes comme la superoxyde dismutase [181].

Lors du phénomène arthrosique, la quantité de NO libérée est augmentée suite à la surexpression d'iNOS [182]. Le NO agit de différentes manières au sein du cartilage arthrosique. Il stimule la production d'IL-1 β par les chondrocytes. Il inhibe la synthèse des PG et du collagène de type II. Il stimule l'action des MMP. Il induit l'apoptose du chondrocyte. Et il joue un rôle dans les phénomènes de vasodilatation

au niveau de l'articulation, en augmentant la perméabilité vasculaire et l'afflux de leucocytes au sein de l'articulation [159-161, 183].

À partir de l'O₂⁻ et du NO, d'autres formes réactives de l'oxygène se forment. Par exemple, la présence de peroxynitrite (ONOO⁻) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est observée (Figure 17). Cet ensemble conduit à un stress oxydant [182].

2.2.4.4.4 Les facteurs angiogéniques

Lors du développement d'arthrose, le cartilage articulaire est envahi par des vaisseaux sanguins, c'est le processus d'angiogenèse. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins résulte d'un déséquilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Cette disproportion peut découler d'une augmentation de production de facteurs pro-angiogéniques ou et/ou d'une diminution de production de facteurs anti-angiogéniques.

Les PG jouent un rôle anti-angiogénique important. En effet, la diminution du contenu en PG de la matrice extracellulaire est associée à l'invasion vasculaire du cartilage [184]. Ceci s'explique par le fait que les GAG possèdent des propriétés antiadhésives et par conséquent limitent l'adhésion des cellules endothéliales. La chondroïtine sulfate et l'AH qui composent les GAG en seraient responsables. Lorsque le contenu en GAG est diminué, l'adhérence des cellules endothéliales à la surface du cartilage augmente [185]. Les chondrocytes produisent également des facteurs anti-angiogéniques tels que la thrombospondine-1 (TSP-1) et la chondromoduline-1 (ChM-1) [186].

Le VEGF est un facteur pro-angiogénique largement impliqué dans le développement de l'arthrose. D'autres facteurs pro-angiogéniques tels que l'ostéocalcine, la ténascine, le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), la stanniocalcine 1 (STC1) et la *bone sialoprotein* (BSP) interviennent également [112, 187-190]. Le TNF- α a également une activité pro-angiogénique [191] (Figure 17).

2.2.4.4.5 Les prostanoides

Les prostanoides regroupent les prostaglandines et les thromboxanes. Ils dérivent d'un précurseur commun, l'acide arachidonique, synthétisé à partir des phospholipides membranaires grâce à la phospholipase A₂. L'acide arachidonique

peut être transformé en prostaglandines et thromboxanes via une cascade enzymatique faisant intervenir les COX et les synthases de prostaglandines E (PTGES) [192].

Lors du développement de l'arthrose, l'expression de COX-2 et des PTGES par les chondrocytes, les synoviocytes et les ostéoblastes est accentuée. L'expression accrue de COX-2 est induite par l'IL-1 β et par TNF- α [193]. Par conséquent, la synthèse de PGE₂ augmente (Figure 17). En effet, des quantités anormalement élevées de PGE₂ sont retrouvées dans le fluide synovial de patients arthrosiques [194].

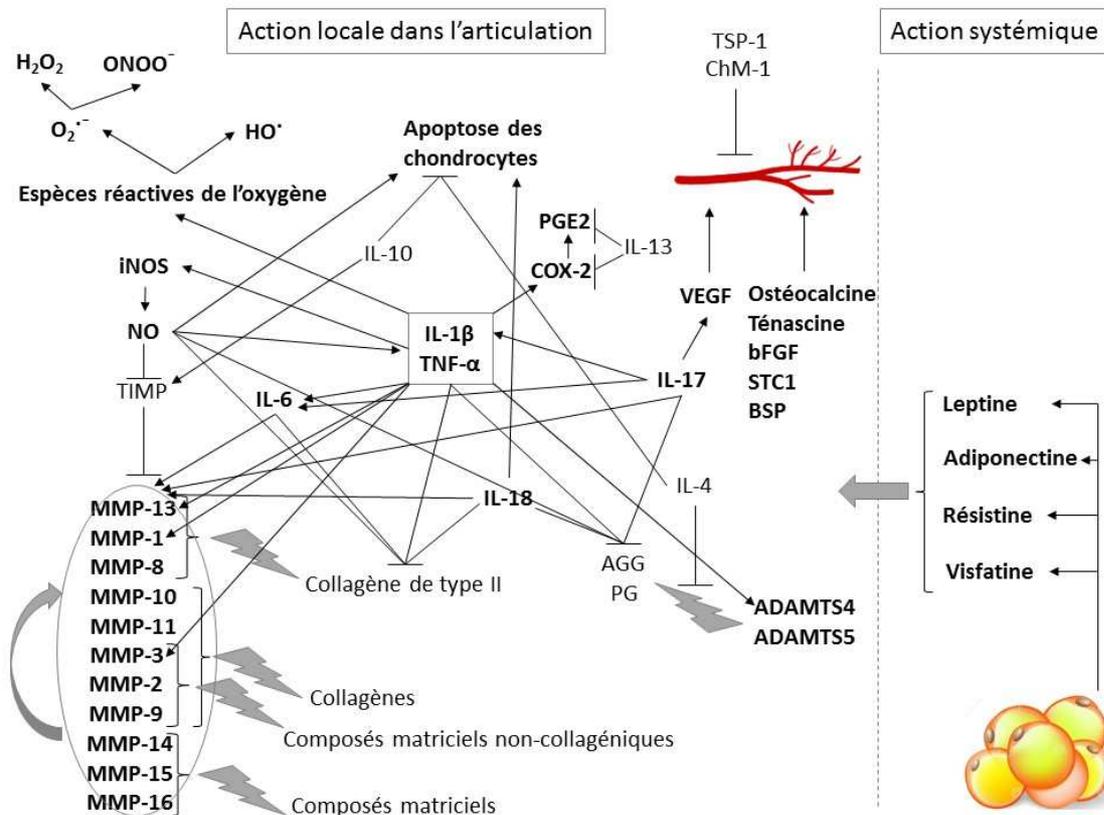


Figure 17. Schéma représentant un résumé de la physiopathologie de l'arthrose. Les facteurs écrits en gras sont ceux qui sont augmentés lors du développement d'arthrose. Les flèches représentent une stimulation. Les éclairs représentent une dégradation. Les lignes représentent une inhibition. ADAMTS=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ; AGG=agrécane ; bFGF=*basic fibroblast growth factor* ; BSP=*bone sialoprotein* ; ChM-1=*chondromoduline-1* ; COX2=*cyclooxygénase 2* ; IL=*interleukine* ; iNOS=*synthase d'oxyde nitrique inductible* ; MMP=*métalloprotéase matricielle* ; NO=*oxyde nitrique* ; PG=*protéoglycane* ; PGE₂=*prostaglandine E₂* ; STC1=*stanniocalcine 1* ; TNF=*tumor necrosis factor*, TSP-1=*thrombospondine-1* ; TIMP=*inhibiteur tissulaire de métalloprotéases* ; VEGF=*vascular endothelial growth factor*.

2.3 Les recommandations pour le traitement de l'arthrose

À ce jour, il n'existe pas de traitement permettant de guérir l'arthrose. La prise en charge de l'arthrose se concentre sur le traitement des symptômes. Les recommandations actuelles pour la prise en charge de l'arthrose incluent une combinaison de modalités pharmacologiques et non pharmacologiques. Les objectifs de ces modalités sont de réduire la douleur et la raideur articulaire, de maintenir et d'améliorer la mobilité, de diminuer l'invalidité du patient et de ralentir la progression des lésions structurales de l'articulation. Par ailleurs, pour les patients souffrant d'une arthrose très sévère, une chirurgie est indiquée [195].

En 2005, l'OARSI réunit un comité de seize experts internationaux dans le but d'uniformiser les traitements de la gonarthrose et de la coxarthrose humaines sur base des recommandations régionales et nationales existantes et de la littérature scientifique publiée [30]. À la suite d'un consensus, l'OARSI publia en 2007 [196], 2008 [197] et 2010 [198] des recommandations internationales globales destinées aux professionnels de la santé et aux patients.

Depuis la dernière publication de 2010, les recommandations pour le traitement de la gonarthrose ont évolué. Dès lors, l'OARSI a demandé à treize experts internationaux une mise à jour des recommandations pour le traitement non chirurgical de l'arthrose humaine du genou, en se basant sur les recommandations précédentes ainsi que sur la littérature plus récente. L'OARSI publia donc, en janvier 2014, des recommandations actualisées de traitement selon quatre sous-phénotypes (Tableau 2) [199]. Cette démarche a permis d'améliorer la spécificité des traitements des patients arthrosiques en fonction de leur état de santé et du nombre d'articulations touchées par l'arthrose. L'analyse des coûts est exclue de cette mise à jour.

Tableau 2. Classification de l'arthrose selon quatre sous-phénotypes. Traduit d'après McAlindon et al., 2014 [199].

Articulation arthrosique	Genoux uniquement : présence d'arthrose symptomatique à un seul ou aux deux genoux uniquement
	Multiplés articulations : présence d'arthrose symptomatique aux genoux et à d'autres articulations (hanche, main, colonne vertébrale, etc.)
Comorbidités	Absence : le patient arthrosique ne présente pas de facteurs de comorbidités
	Présence : le patient arthrosique présente au moins un des facteurs de comorbidités suivants : diabète, hypertension, maladie cardiovasculaire, déficience rénale, saignement gastro-intestinal, dépression ou dépréciation physique limitant son activité, incluant l'obésité.

Pour chacun des quatre sous-phénotypes, l'OARSI a qualifié les modalités thérapeutiques « d'appropriées », « d'incertaines » et « d'inappropriées » sur base des preuves scientifiques disponibles et de l'avis d'experts. Une modalité thérapeutique qualifiée « d'incertaine » peut refléter un état ambigu des preuves actuelles disponibles, une efficacité limitée ou la présence de risques modérément défavorables. Néanmoins, cette qualification n'est pas une recommandation négative ou une exclusion de cette modalité thérapeutique. Le professionnel de la santé, en interaction avec son patient, détermine si cette modalité thérapeutique peut être administrée ou pas, en fonction de la balance risque-bénéfice [199].

Les modalités qualifiées « d'appropriées » pour le traitement non-chirurgical de la gonarthrose sont présentées dans la Figure 18 en fonction des quatre sous-phénotypes cliniques.

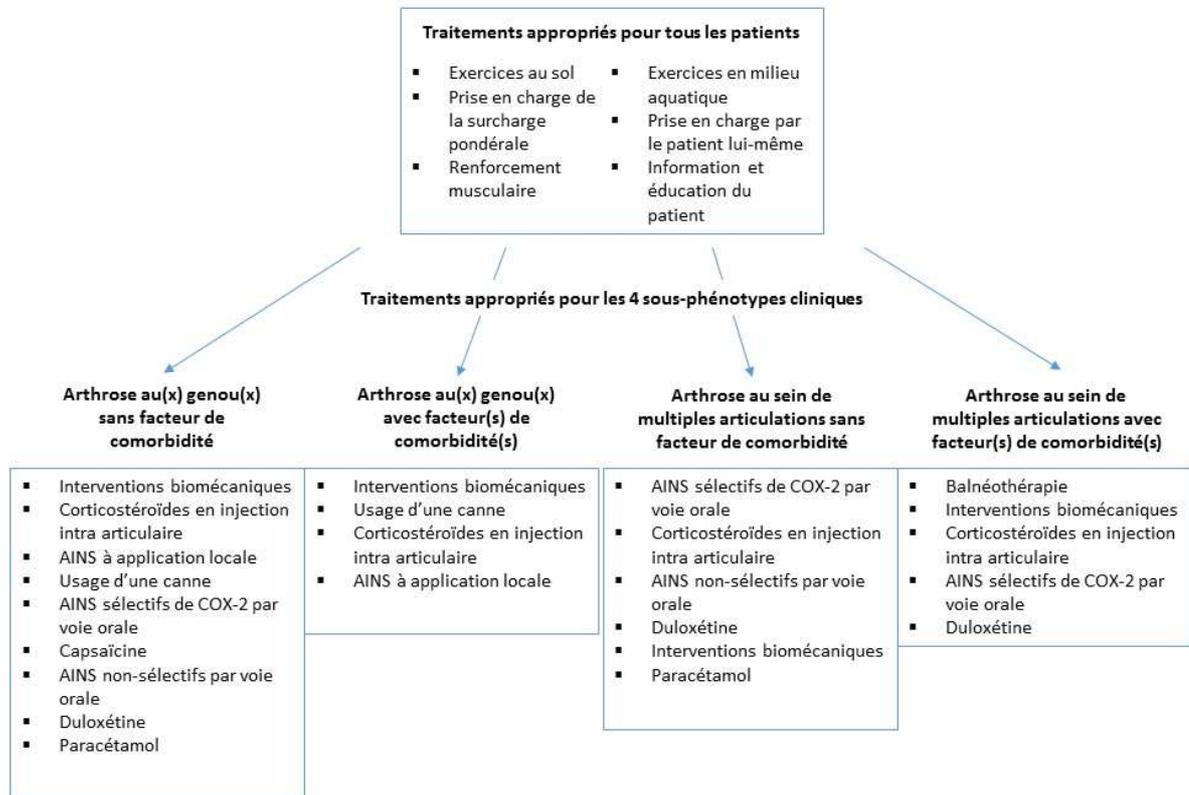


Figure 18. Recommandations de l'OARSI pour le traitement non-chirurgical de l'arthrose. Adapté d'après McAlindon et al., 2014 [199]. AINS=anti-inflammatoires non-stéroïdiens ; COX2=cyclooxygénase 2.

Cependant, ces modalités présentent certaines limitations. En effet, la compliance du patient est faible pour réaliser les exercices physiques et pour réduire sa surcharge pondérale [200]. Administrés pendant de longues durées, le paracétamol entraîne une hépatotoxicité et les AINS occasionnent des lésions gastro-intestinales, une insuffisance rénale et des risques de pathologies cardio-vasculaires. Ceci limite leur utilisation à long terme. Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) ont des effets symptomatiques modérés. Leur action est lente, mais rémanente et ils ne provoquent pas d'effet secondaire. Par conséquent, l'utilisation des AASAL (*Avocado and Soybean Unsaponifiables* (ASU), chondroïtine, glucosamine, églantier) est qualifiée « d'incertaine » par l'OARSI [199]. L'injection intra-articulaire est invasive et présente de ce fait des risques d'infection,

surtout chez les patients diabétiques. De plus, l'injection intra-articulaire d'AH montre des effets symptomatiques modérés [201]. Elle est qualifiée « d'incertaine » par l'OARSI [199]. Enfin, notons que les traitements chirurgicaux sont réservés en dernier recours aux cas d'arthrose très sévères, lorsque les patients ne répondent pas ou plus à la combinaison des modalités pharmacologiques et non pharmacologiques. De plus, la chirurgie est couteuse et invasive (Figure 19).

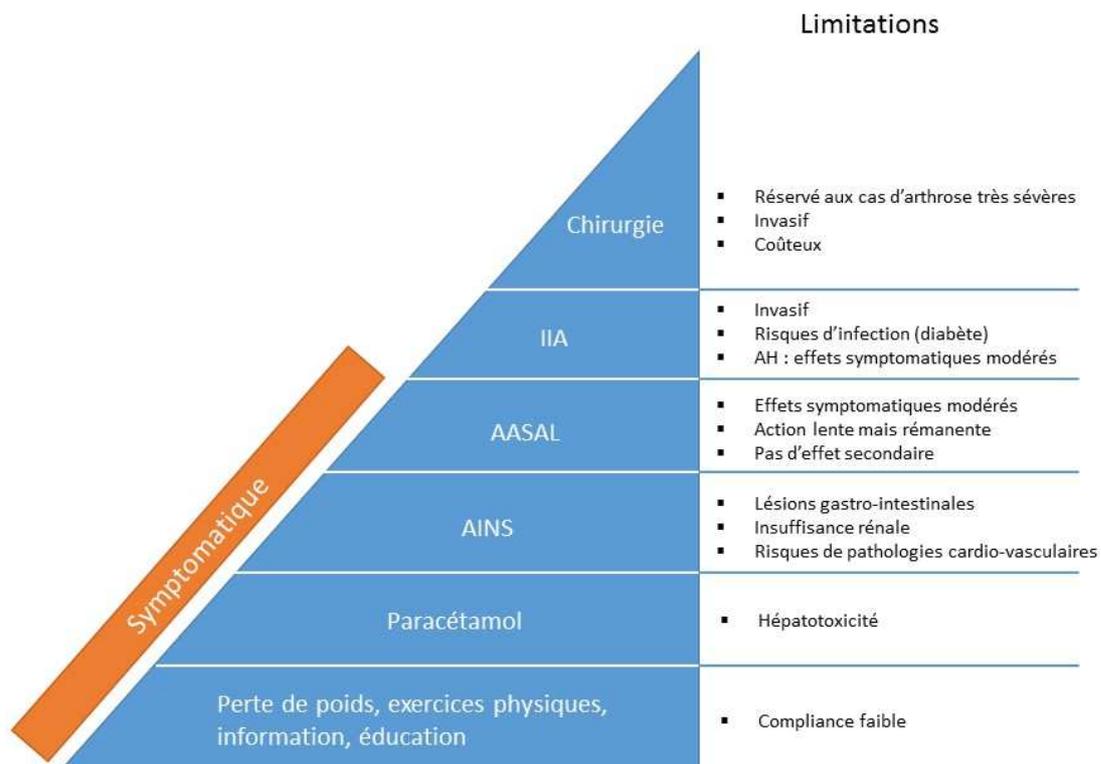


Figure 19. Représentation pyramidale des traitements pour la prise en charge de la gonarthrose et de leurs limitations. Adapté d'après Clegg et al., 2013 [201]. AASAL=anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente ; AH=acide hyaluronique ; AINS=anti-inflammatoires non-stéroïdiens ; IIA=injection intra-articulaire.

2.4 L'arthrose chez le chien

La prévalence de l'arthrose chez les chiens est élevée. En effet, 20 % des chiens âgés de plus d'un an présentent de l'arthrose, à des stades de sévérité variés [202, 203]. Contrairement à l'arthrose humaine, l'arthrose canine est essentiellement secondaire à des désordres musculo-squelettiques congénitaux ou acquis [204]. En effet, plusieurs arthropathies, comme par exemple la luxation congénitale du coude ou de la rotule, peuvent toucher les chiens en bas âge et mener à une arthrose secondaire. À côté de ces anomalies de développement, il existe plusieurs problèmes musculo-squelettiques acquis associés à une détérioration progressive du cartilage. Dans certains cas, un traumatisme induisant une lésion isolée du cartilage peut induire par la suite une lésion étendue progressive et dégénérative. Par exemple, la rupture d'un ligament peut induire quelques semaines plus tard des lésions étendues du cartilage, secondaires à l'instabilité de l'articulation [205]. Les fractures intra-articulaires sont également fréquemment compliquées par une dégradation secondaire du cartilage articulaire [204]. En plus de ces désordres musculo-squelettiques, l'obésité, comme chez l'humain, est un facteur de risque de l'arthrose canine [206] (Figure 20). En effet, limiter la consommation d'aliments énergétiques et maintenir un poids optimal durant la croissance réduit l'incidence et la sévérité de l'arthrose de la hanche mesurée radiologiquement [207]. Par ailleurs, une perte de poids chez les chiens obèses arthrosiques diminue leur boiterie [208].

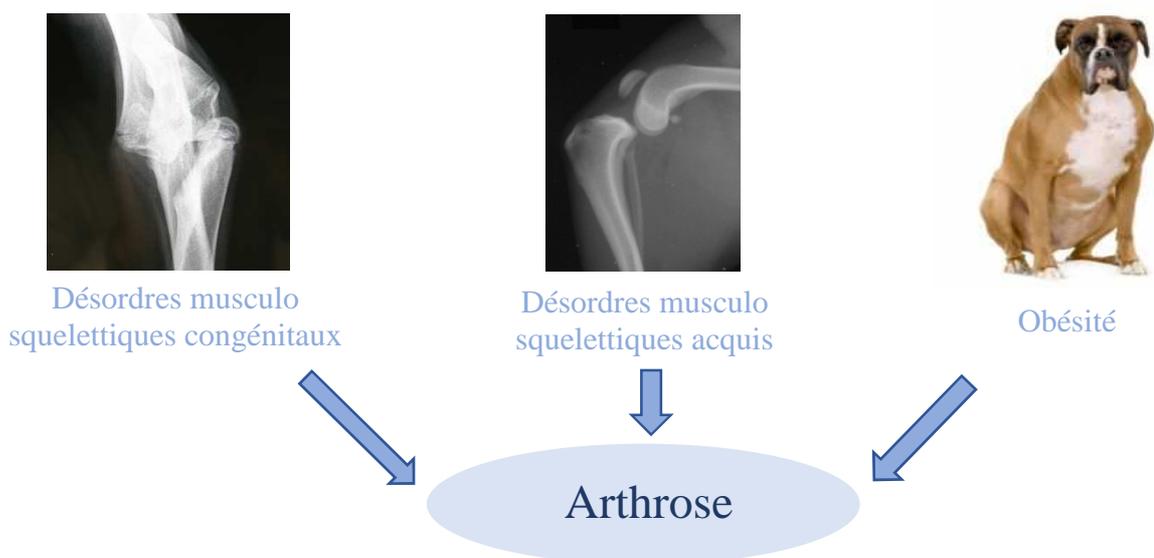


Figure 20. Facteurs de risques de l'arthrose chez le chien.

Comme chez l'humain, la perte de la fonction articulaire liée à l'arthrose est associée chez le chien à des changements dans la structure et la biochimie du cartilage. Un déséquilibre entre les processus cataboliques et anaboliques entraîne la dégradation de la matrice extracellulaire. Des changements dans l'organisation du réseau de collagènes, une réduction du contenu en PG et une réduction de l'épaisseur de la zone superficielle du cartilage sont observés [209]. Les chondrocytes deviennent hypertrophiques et se regroupent pour former des amas de cellules. L'inflammation de la membrane synoviale est également une caractéristique importante de l'arthrose chez le chien et entraîne une inflammation chronique qui endommage la structure articulaire. L'épaississement de l'os sous-chondral, ainsi que l'apparition d'une sclérose, suggèrent une dérégulation dans le remodelage de l'os, liée à l'arthrose [204].

2.4.1 La prise en charge de l'arthrose chez le chien

Afin de diminuer la douleur et l'inflammation associées à l'arthrose, les AINS sont communément prescrits chez le chien [204]. En effet, dans la pratique clinique, beaucoup de chiens arthrosiques sont traités à long terme avec des AINS tels que le carprofen [210]. Les AINS agissent en inhibant notamment les COX et, par-là, en réduisant la concentration des prostaglandines pro-inflammatoires. Malheureusement, l'utilisation des AINS est parfois associée à des effets secondaires néfastes, généralement des lésions du tractus gastro-intestinal [211-213]. L'injection intra-articulaire de stéroïdes est réservée à des stades d'arthrose très sévères ou à des cas réfractaires aux autres traitements [204]. De nombreux actifs nutritionnels sont également utilisés chez le chien pour améliorer leur statut algo-fonctionnel et prévenir la dégradation du cartilage. Les allégations parfois retrouvées sur les emballages d'aliments pour chiens telles que « facilite la gestion de la mobilité », « aide à préserver le cartilage articulaire », « scientifiquement prouvé » ou « complexe exclusif articulations » reposent généralement sur des études cliniques dont les résultats sont résumés dans le Tableau 3 [204, 214].

Tableau 3. Résumé des effets des extraits nutritionnels chez le chien arthrosique.

Référence	Produit	Dose et durée	Modèle	Résultats
Glucosamine/chondroïtine sulfate				
Gupta et al., 2012 [215]	Glucosamine hydrochloride (G-HCl)/chondroïtine sulfate (CS)/collagène de type II glycosylé non-dénaturé (UC-II)	4 groupes : placebo, 10 mg UC-II, 2000 mg G-HCl + 1600 mg CS, 10 mg UC-II + 2000 mg G-HCl + 1600 mg CS/jour 150 jours	Chiens de propriétaires arthrosiques N=4 groupes de 7 à 10	Placebo : pas de changement UC-II : réduction de la douleur à partir du jour 60, augmentation de pic de force verticale (PFV) et impulsion verticale (IV) au jour 90, par rapport au début G-HCl + CS : réduction de la douleur à partir du jour 120, par rapport au début UC-II + G-HCl + CS : réduction de la douleur à partir du jour 120, par rapport au début
Altilio et al., 2007 [216]	G-HCl / CS / UC-II	4 groupes : placebo, 10 mg UC-II, 2000 mg G-HCl + 1600 mg CS, 10 mg UC-II + 2000 mg G-HCl + 1600 mg CS/jour 120 jours	Chiens de propriétaires arthrosiques N=20	Placebo : pas de changement UC-II : réduction de la douleur à partir du jour 30, par rapport au début G-HCl + CS : soulagement de certaines douleurs UC-II + G-HCl + CS : activité générale améliorée par rapport au groupe G-HCl + CS, réduction de la douleur et de la boiterie associée aux exercices
McCarthy et al., 2007 [217]	G-HCl/CS	2 groupes : G-HCl/CS 1 g 2 fois/jour (chien 5-19,9 kg) 1,5 g 2 fois/jour (chiens 20-40 kg) 2 g 2 fois/jour chiens > 40 kg) 42 jours puis dose journalière réduite d'1/3 pour les 28 jours suivants ou carprofène (contrôle positif)	Chiens de propriétaires arthrosiques N=35	G-HCl/CS : diminution de la douleur et de la sévérité de la maladie, par rapport au début Carprofen : diminution de la douleur, de la sévérité de la maladie et de la boiterie, par rapport au début
Collagène				
Beynen et al., 2010 [218]	Hydrolysats de gélatine	2 groupes : placebo ou 10 g/jour 8 semaines	Chiens de propriétaires arthrosiques N=30	Hydrolysats de gélatine : vitalité augmentée, réduction de la raideur et de la boiterie, par rapport au placebo
Peal et al., 2007 [219]	UC-II et/ou (-)-acide hydroxycitrique (HCA-SX) et/ou ChromeMate (CM)	5 groupes : placebo, 10 mg UC-II, 1800 mg HCA-SX, 1800 mg HCA-SX + 100 µg CM, 1800 mg HCA-SX +	Chiens de propriétaires arthrosiques N=25	Placebo : pas de changement UC-II : réduction de la douleur à partir du jour 30, par rapport au début HCA-SX : pas de changement

		100 µg CM + 10 mg UC-II/jour 120 jours		HCA-SX + CM : réduction de la douleur à partir du jour 90, par rapport au début HCA-SX + CM + UC-II : réduction de la douleur à partir du jour 60, par rapport au début
Debarle et al., 2005 [220]	UC-II	3 groupes : placebo, 1 mg, 10 mg/jour 90 jours	Chiens obèses de propriétaires arthrosiques N=15	Placebo : pas de changement 1 mg UC-II : réduction de la douleur et de la boiterie, par rapport au début Activité physique améliorée, par rapport au début 10 mg UC-II : réduction de la douleur et de la boiterie, par rapport au début Activité physique améliorée, par rapport au début
Insaponifiables d'avocat et de soja				
Boileau et al., 2009 [221]	Insaponifiables d'avocat et de soja (ASU)	2 groupes : placebo ou 10 mg/kg/jour 8 semaines	Modèle expérimental de chiens arthrosiques (section du ligament croisé antérieur) N=16	ASU : réduction de la taille des lésions macroscopiques, réduction de la sévérité des lésions du cartilage, réduction des scores histologiques, réduction de la production d'iNOS et MMP-13, réduction de l'épaisseur du cartilage calcifié, par rapport au placebo
Altinel et al., 2007 [222]	ASU	3 groupes : placebo ou 300 mg (approximativement 4 mg/kg) tous les 3 jours ou tous les 3 jours 3 mois	Chiens de berger mâles N=24	Placebo : pas de changement 300 mg tous les 3 jours : augmentation de la concentration de TGF-β1 et TGF-β2 dans le fluide synovial, par rapport au placebo 300 mg tous les jours : augmentation de la concentration de TGF-β1 et TGF-β2 dans le fluide synovial, par rapport au placebo
Curcumine				
Colitti et al., 2012 [223]	Curcumine	3 groupes : chiens arthrosiques recevant 4 mg/kg 2 fois/jour, chiens arthrosiques recevant des AINS, chiens sains 20 jours	12 chiens arthrosiques (6 recevant la curcumine et 6 recevant les AINS) et 6 chiens sains N=18	L'expression des gènes impliqués dans la 'réponse inflammatoire' et dans 'le développement et la fonction des tissus conjonctifs' diminuait plus dans le groupe curcumine que dans le groupe AINS Curcumine inhibait la prolifération des macrophages
Innes et al., 2003 [224]	Curcumine	2 groupes : placebo ou 1 mg/kg/jour	Chiens de propriétaires arthrosiques N=54	Placebo : pas de changement Curcumine : amélioration de la condition selon les investigateurs

Huile de poisson (acide docosahexaénoïque (DHA) et acide eicosapentaénoïque (EPA))				
Hielm-Björkman et al., 2012 [225]	Huile de poisson	2 groupes : huile de maïs (placebo) : 1,7 mg ± 0,09 acides gras omega-3 (principalement acide α-linolénique), Huile de poisson : 110,25 mg ± 5,75 acides gras omega-3 (principalement EPA et DHA) 16 semaines	Chiens de propriétaires arthrosiques N=71	Placebo : réduction du score de la douleur, par rapport au début Huile de poisson : augmentation du PFV et de la qualité de vie, réduction du score de la douleur et de l'utilisation d'AINS, par rapport au début
Fritsch et al., 2010a [226]	Huile de poisson	3 groupes : placebo (aliment commercial), aliment expérimental avec 2 fois plus de concentrations d'EPA + DHA, aliment expérimental avec 3 fois plus de concentrations d'EPA + DHA 90 jours	Chiens de propriétaires arthrosiques N=177	Placebo : pas de changement 2-fois plus EPA + DHA : pas de changement 3-fois plus EPA + DHA : amélioration de la boiterie et de l'état général, par rapport au début
Fritsch et al., 2010b [227]	Huile de poisson	2 groupes : contrôle avec peu d'acides gras omega-3 ou aliment enrichi en acides gras omega-3 12 semaines	Chiens de propriétaires arthrosiques N=131	Omega-3 : réduction plus rapide de l'utilisation du carprofène, par rapport au contrôle
Roush et al., 2010a [228]	Huile de poisson avec des concentrations élevées d'acides gras omega-3	2 groupes : placebo (aliment commercial) ou aliment contenant 3,5 % d'huile de poisson 90 jours	Chiens de propriétaires arthrosiques N=38	Placebo : pas de changement Huile de poisson : augmentation du PFV et amélioration de la boiterie, par rapport au début
Roush et al., 2010b [229]	Huile de poisson avec des concentrations élevées d'acides gras omega-3 Faible rapport omega-6/omega-3	2 groupes : placebo (aliment commercial) ou aliment avec 31-fois plus d'acides gras omega-3 24 semaines	Chiens de propriétaires arthrosiques N=127	Huile de poisson : concentrations sériques plus élevées d'acides gras omega-3, concentrations sériques plus faibles en acide arachidonique, amélioration de la capacité à se lever, à jouer et à marcher, par rapport au placebo
Hansen et al., 2008 [230]	Huile de poisson	2 groupes : 90 mg EPA+DHA/kg/jour ou 4,5 mg EPA+DHA/kg/jour 63 jours (1 semaine avant la chirurgie et 56 jours après la chirurgie)	Modèle expérimental de chiens arthrosiques (section du ligament croisé antérieur) N=24	90 mg EPA+DHA/kg : concentrations sériques plus faibles en acide arachidonique

LeBlanc et al., 2008 [231]	Huile de poisson Rapport omega-6/omega-3 = 3,4	3 groupes : contrôle (huile de tournesol), aliment avec huile de poisson, aliment avec huile de poisson + α -tocophérol acétate 75 g EPA/kg aliment 2,2 g DHA/kg aliment 12 semaines	Chiens sains N=15	Huile de poisson : concentrations sériques plus faibles en IL-1, IL-6 et PGE ₂ , par rapport aux chiens recevant l'huile de tournesol
Green Lipped Mussel				
Rialland et al., 2013 [232]	<i>Green Lipped Mussel</i> (GLM) (<i>Perna Canaliculus</i>)	1 groupe : aliment contrôle (30 jours) et ensuite aliment enrichi en GLM (60 jours) 90 jours	Chiens de propriétaires arthrosiques N=23	Augmentation des concentrations sériques en acides gras omega-3 au jour 90, par rapport au jour 30 Augmentation du PFV au jour 90, par rapport au jour 30
Hielm-Björkman et al., 2009 [233]	GLM (<i>Perna Canaliculus</i>)	2 groupes : placebo ou 20-49 mg/kg/jour, en fonction de la masse du chien, pendant 10 jours, et ensuite la moitié de la dose pour le reste de l'étude 8 semaines	Chiens de propriétaires arthrosiques N=45	GLM : mobilité améliorée et réduction de la douleur, par rapport au placebo
Pollard et al., 2006 [234]	GLM (<i>Perna Canaliculus</i>)	2 groupes : placebo ou 375 mg/jour (chiens 5-15 kg) 625 mg/jour (chiens 16-20 kg) 750 mg/jour (chiens 21-25 kg) 1000 mg/jour (chiens 26-45 kg) 1125 mg/jour (chiens >46 kg) 56 jours	Chiens de propriétaires diagnostiqués avec une maladie articulaire dégénérative N=81	Placebo : signes cliniques améliorés au jour 28 GLM : signes cliniques améliorés au jour 28, meilleurs scores musculosquelettiques, signes cliniques améliorés au jour 56 pour une plus grande proportion de chiens, par rapport au placebo Aucun signe de toxicité
Servet et al., 2006 [235]	GLM (<i>Perna Canaliculus</i>)	1 groupe : aliment contenant 0,3 % de GLM 45 jours	Chiens de propriétaires arthrosiques N=85	Mobilité améliorée, par rapport au début Réduction de la douleur, du gonflement, des crépitements et du score arthrosique, par rapport au début

2.5 Les actifs nutritionnels

Bien que les AINS et les analgésiques soient recommandés dans certains contextes d'arthrose, ils peuvent présenter, principalement lors de leur utilisation à long terme, des effets secondaires néfastes, tant chez l'humain que chez le chien. Des troubles du tractus gastro-intestinal sont majoritairement observés [213, 236]. Dès lors, une thérapie alternative efficace et plus saine est nécessaire [237]. Cette thérapie pourrait provenir de la nutrition. En effet, outre le fait que l'arthrose soit une maladie chronique, la nutrition peut fournir des bénéfices à long terme.

Le terme « nutraceutique » provient de la contraction des mots « nutrition » et « pharmaceutique ». Ce sont des micronutriments isolés ou extraits de l'alimentation, d'animaux (par exemple de coquilles de crustacés) ou de plantes, présentés sous forme galénique (comprimé, gélule, poudre, potion...) et ayant des effets bénéfiques sur la santé, notamment dans le cadre de la prise en charge des maladies chroniques [238]. Néanmoins, précisons que le terme « nutraceutique » n'a pas de valeur légale, contrairement au terme « complément alimentaire » qui est régi par la Directive européenne 2002/46/CE du 10 juin 2002 et qui y est défini comme étant une source concentrée de nutriments, conçus pour compléter l'apport en nutriments d'un régime alimentaire normal. Les notions de bénéfice pour la santé et de prise en charge des maladies chroniques n'entrent pas dans la définition du « complément alimentaire ». Afin d'éviter toute confusion, nous utiliserons dans ce manuscrit le terme « actif nutritionnel ».

Beaucoup d'actifs nutritionnels ont déjà été étudiés chez l'humain, avec différents niveaux de preuve scientifique [239, 240]. L'attractivité d'une nutrition adaptée se trouve aussi dans le fait qu'elle est exempte d'effets secondaires néfastes, contrairement à la plupart des traitements pharmacologiques. Par ailleurs, l'absence de traitement renforce l'importance de la prévention.

Nous nous sommes plus principalement intéressés aux effets de trois extraits nutritionnels *in vitro* et *in vivo* chez le chien. Les effets du collagène hydrolysé, de l'extrait de curcuminoïdes et de l'extrait de thé vert sont décrits ci-après.

2.5.1 Collagène hydrolysé

Le collagène hydrolysé est obtenu par hydrolyse enzymatique de tissus animaux riches en collagène, comme l'os par exemple. Le collagène hydrolysé est généralement reconnu comme un extrait naturel sain [241, 242]. La caractéristique principale du collagène hydrolysé est sa composition en acides aminés, élevée en glycine et en proline, deux acides aminés essentiels pour la stabilité et la régénération du cartilage [243].

In vitro, la synthèse des PG et du collagène de type II, et l'expression des AGG par des chondrocytes bovins et porcins étaient augmentées avec le collagène hydrolysé [244, 245].

In vivo, l'administration orale de collagène de type II non dénaturé à des chiens arthrosiques diminuait la douleur et augmentait le pic de force verticale et l'aire d'impulsion, mesurés par des plateformes de force, indiquant également une diminution de la douleur associée à l'arthrose [215]. Des chiens arthrosiques nourris avec un aliment additionné quotidiennement de 10 g d'un hydrolysate de gélatine montraient une vitalité augmentée et une diminution de la raideur et de la boiterie évaluée par les propriétaires, après huit semaines [218]. Des chiens arthrosiques et obèses recevaient journalièrement 1 g ou 10 g de collagène de type II non dénaturé. La douleur globale, la douleur lors de la manipulation des membres et la boiterie après un exercice physique diminuaient, et ce plus fortement chez les chiens ayant reçu 10 g de collagène/jour. Le niveau d'activité physique était également augmenté [216, 219, 220]. Dans toutes ces études, l'effet du collagène hydrolysé était comparé à un placebo. Le collagène hydrolysé semblait sain et bien toléré par les chiens arthrosiques [215, 216, 218-220]. À notre connaissance, il n'existe pas d'étude évaluant l'absorption et la distribution tissulaire du collagène chez les chiens.

2.5.2 Extrait de curcuminoïdes

La curcumine est un composant majeur du curcuma, une épice jaune dérivée des racines de la plante *Curcuma longa*. La curcumine est un polyphénol et est utilisée depuis très longtemps dans la médecine traditionnelle chinoise et ayurvédique [246] (Figure 21).

humains a été proposée dans laquelle la curcumine est piégée dans des micro-émulsions formées par de l'huile essentielle de curcuma et du polysorbate 80, un émulsifiant de l'équilibre hydrophile-lipophile [251]. Cependant, le polysorbate 80 peut causer des réactions d'hypersensibilités sévères chez les chiens, qui sont des réactions anaphylactiques sévères non immunitaires typiques (pseudo-allergies) caractérisées par la libération d'histamine et d'anticorps immunoglobuline (Ig) E. Ces découvertes posent question quant à l'utilisation du polysorbate 80 chez les chiens [253].

Dans le but de mieux connaître la pharmacodynamique de la curcumine, les concentrations plasmatiques de la curcumine et de son métabolite, la tétrahydrocurcumine (THC), étaient mesurées chez des Beagles, après l'infusion intra-veineuse de curcumine liposomale (dose totale de 10 mg/kg infusée sur une période de 2 ou de 8 h). Il était nécessaire de stabiliser la curcumine avec de l'acide phosphorique pour autoriser des déterminations quantitatives précises de curcuminoïdes dans le plasma. Les concentrations de THC (2 h : AUC = 3796 ng/ml·h et C_{max} = 983 ng/ml ; 8 h : AUC = 1171 ng/ml·h et C_{max} = 293 ng/ml) étaient 6,3 à 9,6 fois plus élevées que celles de la curcumine (2 h : AUC = 394 ng/ml·h et C_{max} = 319 ng/ml ; 8 h : AUC = 187 ng/ml·h et C_{max} = 66 ng/ml) durant les deux vitesses d'infusion. Les demi-vies plasmatiques des deux composés après les 2 h d'infusion variaient de 0,4 à 0,7 h [254]. Bien sûr, l'utilisation de curcumine administrée en intra-veineuse pour un traitement à long terme n'est pas faisable, mais cette étude aide à comprendre la pharmacodynamique de la curcumine. La concentration de curcumine mesurée dans le sang après infusion intra-veineuse de curcumine liposomale chez le chien est inférieure à la concentration montrant des activités biologiques dans les études *in vitro*. Dès lors, la transposition des données *in vitro* à une situation *in vivo* doit être réalisée avec précaution.

2.5.3 Extrait de thé vert

L'extrait de thé vert est issu des feuilles de la plante *Camellia sinensis*. L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est le composant majeur de la fraction polyphénolique du thé vert et présente des propriétés anti-oxidantes, anti-tumorales et anti-mutagènes [239] (Figure 22).

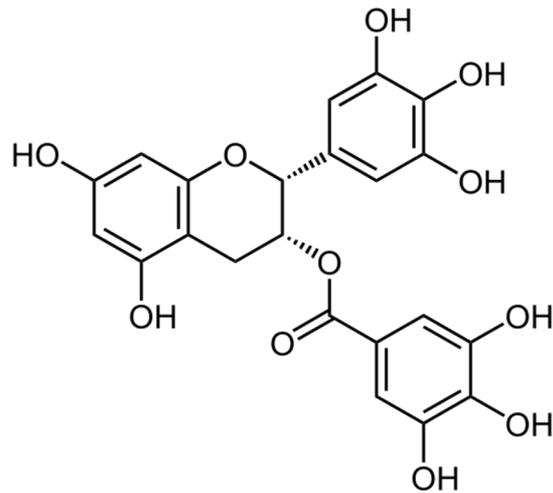


Figure 22. Structure chimique de l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG).

In vitro, l'EGCG inhibait l'expression de TNF- α et de MMP-13 par des chondrocytes arthrosiques humains stimulés par des produits de glycation. De plus, la voie de signalisation des MAPK et l'activation d'NF- κ B, stimulées par des produits de glycation, étaient atténuées en présence d'EGCG [255]. La synthèse d'MMP-1 et MMP-13, et l'activation de la voie NF- κ B, stimulées par l'IL- β , étaient également inhibées par l'EGCG [256, 257].

In vivo, l'effet de l'extrait de thé vert n'a jamais directement été évalué sur des chiens arthrosiques. Cependant, l'arthrose étant part du syndrome métabolique, comme l'obésité et la résistance à l'insuline, une étude évaluant les effets du thé vert dans un modèle de chien obèse résistant à l'insuline a été réalisée. Dans cette étude, la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique étaient meilleurs lorsque les chiens avaient reçu de l'EGCG pendant douze semaines, par rapport aux contrôles. L'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique et du glucose était également modifiée par l'EGCG [258].

L'absorption, la distribution tissulaire et l'élimination de l'EGCG ont été évaluées chez des Beagles. Une dose unique d'EGCG radiomarqué ^3H (250 mg/kg) administrée oralement était rapidement absorbée. En effet, les concentrations plasmatiques étaient maximales 1 h après l'administration et la demi-vie était de 8,61 h. La distribution tissulaire était analysée 1 h après une injection intra-veineuse de 25 mg/kg d'EGCG radiomarqué ^3H , réalisée après 27 jours de traitement oral d'EGCG radiomarqué ^3H (250 mg/kg), afin de mimer la consommation chronique de

thé vert. Les concentrations les plus élevées de radioactivité étaient observées dans le foie et les tissus du tube digestif. L'excrétion via les fèces prédominait sur l'excrétion urinaire [259]. De l'EGCG radiomarqué ^3H a également été administré oralement (200 μl 0,05 % EGCG) à des souris. La radioactivité était également retrouvée dans le foie et le tube digestif, mais aussi dans les poumons, le pancréas, les glandes mammaires, la peau, l'os, le cerveau, les reins, les ovaires, l'utérus et les testicules [260].

3 PARTIE *IN VITRO*

3.1 Introduction

Notre objectif était d'évaluer l'effet de divers actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes. Nous avons choisi un modèle de culture de chondrocytes en deux dimensions, aussi appelé en monocouche. Ce modèle est adapté à l'évaluation d'un grand nombre de molécules. De plus, les cellules sont directement en contact avec l'agent testé. Elles peuvent être facilement récupérées et différents extraits cellulaires peuvent être analysés. A contrario, ce modèle présente certains inconvénients. Lorsqu'ils sont cultivés en monocouche sur un support en plastique, les chondrocytes prolifèrent et perdent progressivement leur phénotype. C'est pour cette raison que seules des cultures primaires ont été utilisées dans notre travail. Enfin, ce modèle n'est pas recommandé pour l'étude de la synthèse et de l'organisation de la matrice extracellulaire. En effet, la faible quantité de matrice présente autour des chondrocytes, par rapport à un modèle de culture en trois dimensions, ne permet pas d'étudier les interactions entre la molécule testée et les composants de la matrice.

Des chondrocytes d'origine bovine ont d'abord été utilisés dans un souci de facilité d'obtention et de disponibilité des prélèvements. Par ailleurs, la cellularité du cartilage bovin est plus dense que celle du cartilage humain. En effet, un grand nombre de cellules était nécessaire pour la première partie de notre étude étant donné les multiples actifs nutritionnels que nous souhaitions évaluer. L'origine bovine des chondrocytes nous permettait d'obtenir un cartilage jeune et sain. Le métabolisme du cartilage canin est plus proche du cartilage bovin que du cartilage humain. Nous n'avons pas utilisé de cartilage canin pour différentes raisons. Premièrement, la quantité de cellules disponibles sur une articulation canine était insuffisante pour évaluer nos différents actifs nutritionnels. Deuxièmement, Royal Canin ne nous y autorisait pas pour des raisons éthiques. Troisièmement, les prélèvements de cartilage canin étaient moins faciles à obtenir. Et quatrièmement, la caractérisation du cartilage obtenu (sain ou arthrosique) n'était pas précise.

Lorsque les actifs nutritionnels et les concentrations adéquates ont été sélectionnés, des chondrocytes d'origine humaine ont alors été employés. Ces derniers étaient plus appropriés pour la réalisation de l'analyse de puces à ADN et l'étude des voies de signalisation spécifiques de l'arthrose. De plus, cette approche nous a permis d'étudier les actifs sur des chondrocytes pathologiques (arthrosiques), ce qui n'était pas possible chez le bovin.

3.1.1 Objectifs

Phase 1 ou sélection des actifs nutritionnels : le premier objectif était de comparer les effets de treize actifs nutritionnels sur des chondrocytes primaires bovins cultivés en monocouche. Les actifs nutritionnels ont été sélectionnés sur base de notre expertise, de l'avis d'experts en nutrition animale, de la littérature scientifique et de l'analyse des contraintes réglementaires et d'industrialisation. Ces treize actifs nutritionnels, testés individuellement, étaient : l'aloë vera, ASU, une préparation de collagène hydrolysé, un extrait de curcuminoïdes, l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA), un extrait de Green Lipped Mussel (GLM), une huile de poisson, un extrait d'ortie, le pycnogénol (écorce de pin), le resvératrol, un extrait de thé vert et un mélange de vitamines (Tableau 4). Ils ont été testés en présence ou non d'IL-1 β . L'IL-1 β était ajoutée pour reproduire en partie *in vitro* le déséquilibre métabolique observé *in vivo* chez les chondrocytes arthrosiques. Dans deux cultures, les actifs nutritionnels et l'IL-1 β étaient ajoutés simultanément. Dans une culture, les cellules étaient cultivées pendant 48 h en présence des actifs nutritionnels avant l'ajout d'IL-1 β . Au terme de cette phase et en considérant notre objectif final qui était de mettre au point une alimentation canine, nous avons sélectionné plusieurs actifs nutritionnels sur base des critères scientifiques, industriels et réglementaires suivants :

- absence de signe de cytotoxicité ;
- amplitude de l'effet sur les paramètres inflammatoires et/ou cataboliques et/ou anaboliques ;
- absence de toxicité montrée chez les petits animaux ;
- digestibilité chez les chiens ;
- disponibilité ;

- stabilité ;
- cout ;
- existence de brevets, liberté d'exploitation ;
- autorisation dans les aliments canins par le Registre Communautaire des Additifs Alimentaires conformément au Règlement (CE) numéro 1831/2003 [261].

Phase 2 ou identification de la concentration optimale : nous avons testé les actifs nutritionnels sélectionnés à des doses croissantes afin de déterminer la concentration optimale. Les effets ont été recherchés en absence et en présence d'IL-1 β .

Phase 3 ou recherche des effets additifs et synergiques : nous avons recherché les effets additifs et synergiques de ces actifs nutritionnels sur des paramètres du catabolisme, de l'anabolisme et de l'inflammation. Dans ce but, nous avons testé des mélanges de deux ou trois actifs nutritionnels, en absence et en présence d'IL-1 β .

Phase 4 ou confirmatoire : nous avons confirmé les résultats obtenus durant les phases précédentes sur des chondrocytes primaires humains cultivés en monocouche. Sur ce modèle, nous avons également étudié les effets des actifs nutritionnels sur la voie de signalisation NF- κ B activée par l'IL-1 β . Sur base des résultats obtenus lors des phases 3 et 4, nous avons choisi la combinaison d'actifs nutritionnels avec les propriétés biologiques les plus intéressantes pour le traitement de l'arthrose.

Phase 5 ou mécanistique : afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du mélange d'actifs nutritionnels, la technique de biopuces à ADN a été utilisée. Le mélange d'actifs nutritionnels était ajouté aux chondrocytes primaires humains à la concentration optimale définie, en présence d'IL-1 β ou non. Cette analyse de biopuces à ADN a permis d'identifier des gènes qui étaient exprimés différemment en présence ou en absence du mélange d'actifs nutritionnels, et en présence d'IL-1 β ou non. Nous avons utilisé des dosages immunologiques pour confirmer les gènes identifiés qui étaient exprimés différemment par les chondrocytes primaires

humains, en présence ou en absence du mélange d'actifs nutritionnels, et en présence d'IL-1 β ou non.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Origine des chondrocytes et déclaration éthique

Le cartilage articulaire normal bovin était obtenu à « l'Abattoir Public de Liège », à partir de l'articulation métacarpo-phalangienne de bovins âgés de 1 à 2 ans, dans les 2 h suivant la mort de l'animal. Le cartilage articulaire arthrosique humain était prélevé pendant l'intervention chirurgicale pour la pose d'une prothèse totale du genou. Le cartilage articulaire était prélevé aux niveaux des plateaux fémoral et tibial et de la rotule. Tous les prélèvements utilisés ont été obtenus après le consentement éclairé du patient. Dans un premier temps, l'étude a été expliquée à ce dernier oralement par le chirurgien orthopédique, et dans un second temps un consentement écrit a été recueilli. Cette procédure de consentement a été approuvée par le Comité d'Ethique de l'Université Catholique de Louvain (numéro du dossier : B403201214793).

3.2.2 Isolement des chondrocytes

Le cartilage articulaire était prélevé, découpé en fragments de 1 mm³ et placé dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contenant du rouge phénol et 4,5 g/L de glucose (Lonza, Verviers, Belgique), 10 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (Lonza, Verviers, Belgique), 100 U/ml de pénicilline (Lonza, Verviers, Belgique) et 0,1 mg/ml de streptomycine (Lonza, Verviers, Belgique). Après trois lavages, les chondrocytes étaient extraits du cartilage par plusieurs digestions enzymatiques successives à l'aide d'hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), de pronase E (Merck, Leuven, Belgique) et de collagénase (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) (0,5 mg/ml de hyaluronidase de type IV S pendant 30 min à 37 °C, 1 mg/ml de pronase E pendant 1 h à 37 °C et 0,5 mg/ml de collagénase IA pendant 16 à 20 h à 37 °C). Les chondrocytes étaient ensuite filtrés à travers un filtre de nylon avec des pores de 70 µm, lavés trois fois, comptés et mis en suspension dans du DMEM supplémenté de 10 % de FBS (foetal bovine serum) (Lonza, Verviers, Belgique), 10 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine (Lonza, Verviers, Belgique) et 20 µg/ml de proline (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) à la densité cellulaire de 0,25 x 10⁶ cellules/ml

pour les chondrocytes bovins ou de $0,1 \times 10^6$ cellules/ml pour les chondrocytes humains.

3.2.3 Description des actifs

Le tableau 4 présente les caractéristiques des treize actifs nutritionnels utilisés dans notre travail. La dose testée a été choisie en se basant sur des données de la littérature scientifique (Tableau 4).

Tableau 4. Caractéristiques des treize actifs nutritionnels évalués lors de la phase 1 de sélection.

Actif nutritionnel	Nom de la marque	Fournisseur	Composition	Concentration utilisée pour la phase 1 de sélection
Aloe vera	Aloe vera PE 200 :1 WS	Naturex, Avignon, France	Extrait naturel (100 %)	100 µg/ml [262]
Insaponifiables d'avocat et de soja (ASU)	Avovida™	Sochim, Cornaredo, Italie	Phytosterols (45 %), protéines (29 %), graisses (11 %), autres : isolat protéique de soja, tocophérols, dioxyde de silicone	10 µg/ml [263]
Collagène hydrolysé	Fortigel®	Gelita, Eberbach, Allemagne	Mix de différents peptides. En moyenne, les peptides sont composés de 30 acides aminés, ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 3 kDa. La glycine et la proline représentent plus de 35 % du contenu total en acides aminés.	10^{-5} M = 33 µg/ml
Extrait de curcuminoïdes	Turmipure™	Naturex, Avignon, France	Oléorésine extraite à partir des racines de la plante <i>Curcuma longa</i> . Composée d'extrait naturel et de méthylcellulose. Son contenu en curcuminoïdes est environ de 82 %, desquels 75 % sont de la curcumine, 21 % sont de la déméthoxycurcumine et 4 % sont de la	10^{-5} M = 3,68 µg/ml [250]

			bisdéméthoxycurcumine	
Acide docosahexaénoïque (DHA)	Cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic acid	Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique	Cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic acid	10^{-5} M = 3,28 µg/ml [264]
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	Cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid	Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique	Cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid	10^{-5} M = 3,02 µg/ml [264]
Green Lipped Mussel (GLM)	Glycomega	Aroma, Christchurch, Nouvelle-Zélande	100 % provenant de la coque de moules vertes cultivées (élevage) dans la région de Marlborough Sounds en Nouvelle-Zélande (lipides, carbohydrates, protéines)	180 µg/ml [265]
Huile de poisson	Ropufa	DSM, Heerlen, Pays-Bas	Omega 3 (32 %), omega 6 (3,3 %), EPA + DHA (27 %), hydroxyanisole butylé, acide carnosique	10^{-5} M d'équivalent EPA = 77,5 µg/ml [264]
Extrait d'ortie	Nettle leaf PE	Naturex, Avignon, France	Extrait naturel, maltodextrine	10 µg/ml [266]
Extrait de pin	Pycnogenol®	Horphag Research, Genève, Suisse	Procyanidines (74 %)	25 µg/ml [267]
Resvératrol	ResVida™	DSM, Heerlen, Pays-Bas	Trans-resvératrol (99,5 %)	10^{-5} M = 2,28 µg/ml [268]
Extrait de thé vert	Green Tea PE 25 %	Naturex, Avignon, France	Obtenu à partir des feuilles de la plante de thé vert (<i>Camellia sinensis</i> L.). Composé d'extrait naturel et de maltodextrine. Son contenu total en polyphénols est de plus de 25 %, son contenu en catéchines de plus de 12,5 % et son contenu en EGCG de plus de 9,3 %.	10^{-5} M d'équivalent épigallocatechine-3-gallate (EGCG) = 49,29 µg/ml [256]
Vitamines	Dog Vitamin premix	Société française de prémix et spécialités,	Le mélange de vitamines est composé principalement de vitamine E (23350 mg/kg). Il contient aussi	10^{-5} M d'équivalent vitamine E = 184,58 µg/ml

		Saint-Nolff, France	de la vitamine A (750 mg/kg), de la vitamine C (135 mg/kg), de la vitamine D (4,7 mg/kg) et des vitamines B. Toutes ces vitamines sont contenues dans de la farine de maïs.	
--	--	------------------------	---	--

3.2.4 Culture des chondrocytes

Les chondrocytes étaientensemencés dans des plaques six puits à la densité de $0,5 \times 10^6$ cellules/puits (chondrocytes bovins) ou $0,2 \times 10^6$ cellules/puits (chondrocytes humains) en ajoutant 2 ml du milieu de culture (voir composition dans le paragraphe précédent) par puits. Les chondrocytes étaient cultivés en monocouche pendant environ cinq jours jusqu'à atteindre quasiment 95 % de confluence (Figure 23). Les chondrocytes étaient ensuite cultivés pendant 24 h dans du DMEM enrichi avec 1 % de FBS, 10 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine et 20 μ g/ml de proline. Seules des cultures primaires ont été réalisées pour assurer la stabilité du phénotype des chondrocytes.

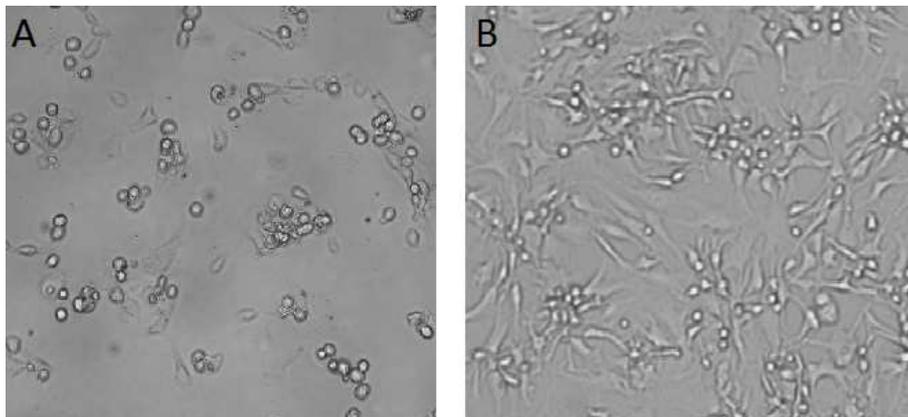


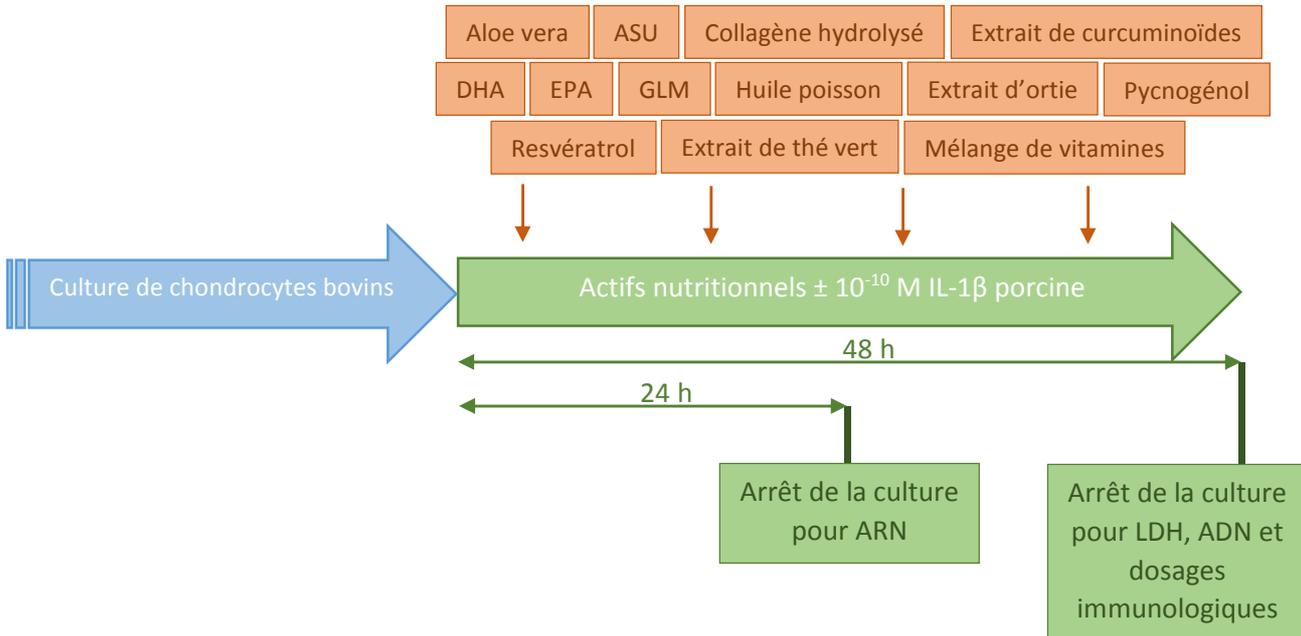
Figure 23. Photographies de chondrocytes humains. A : lorsqu'ils étaient ensemencés. B : après 5 jours de culture.

Quand les chondrocytes bovins atteignaient environ 95 % de confluence, le milieu de culture était enlevé et remplacé par du milieu de culture frais (DMEM enrichi avec 1 % de FBS, 10 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine et 20 μ g/ml de proline) contenant ou non les actifs nutritionnels et/ou de l'IL-1 β porcine recombinante 10^{-10} M (R&D System,

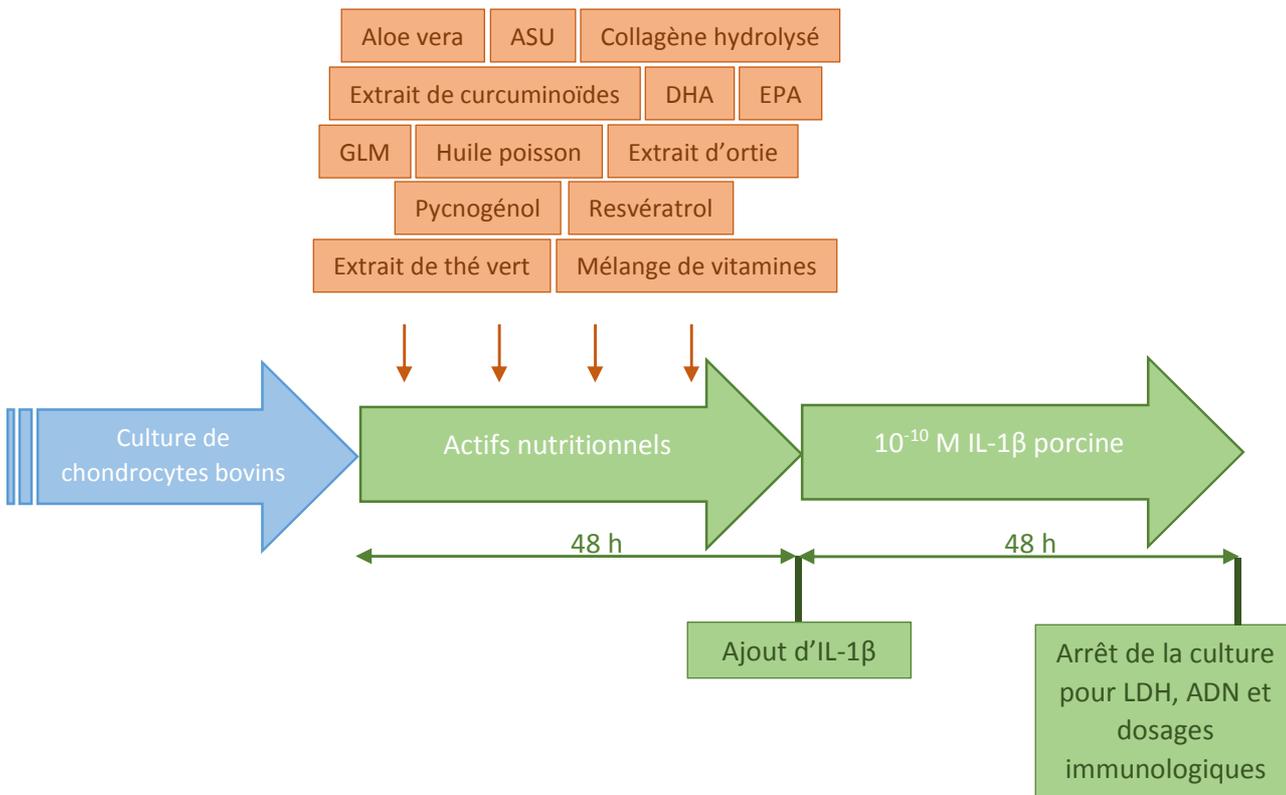
Abingdon, Royaume-Uni), afin de mimer les chondrocytes arthrosiques. Dans un premier temps, les treize actifs nutritionnels (aloe vera, ASU, préparation de collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines) ont été étudiés aux concentrations décrites dans le Tableau 4, en absence ou en présence de 10^{-10} M d'IL-1 β porcine recombinante. Les ASU, l'extrait de curcuminoïdes et l'huile de poisson ont été dissouts dans du tétrahydrofurane (THF) et ensuite ajoutés au milieu de culture, respectivement à la concentration finale de 10 $\mu\text{g/ml}$, 3,68 $\mu\text{g/ml}$ et 77,5 $\mu\text{g/ml}$. Le DHA, l'EPA, le pycnogénol, le resvératrol et le mélange de vitamines ont été dissouts dans de l'éthanol et ensuite ajoutés dans le milieu de culture, respectivement à la concentration finale de 3,28 $\mu\text{g/ml}$, 3,02 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 2,28 $\mu\text{g/ml}$ et 184,58 $\mu\text{g/ml}$. L'aloe vera, le collagène hydrolysé, la GLM, l'extrait d'ortie et l'extrait de thé vert ont été dissouts dans de l'eau milliQ, filtrés à travers un filtre stérile composé de pores de 0,20 μm et ajoutés ensuite dans le milieu de culture, respectivement à la concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$, 33 $\mu\text{g/ml}$, 180 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ et 49,29 $\mu\text{g/ml}$. Les mêmes quantités de THF et d'éthanol (0,1 %) étaient ajoutées pour chaque condition. Trois cultures ont été réalisées et, dans chaque culture, chaque condition expérimentale a été reproduite trois fois. Deux cultures ont été réalisées en incubant simultanément les actifs nutritionnels et l'IL-1 β (co-incubation) pendant 24 ou 48 h et une culture a été réalisée en cultivant les chondrocytes pendant 48 h avec les actifs nutritionnels avant l'administration d'IL-1 β (48 h). Dans un deuxième temps, les actifs nutritionnels sélectionnés (C=extrait de curcuminoïdes, O=collagène hydrolysé et T=extrait de thé vert) ont été étudiés aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$, en absence ou en présence de 10^{-10} M d'IL-1 β porcine recombinante. Dans un troisième temps, afin de rechercher leurs effets additifs ou synergiques, les actifs nutritionnels ont été étudiés à la concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$, seuls ou en mélanges (12,5 $\mu\text{g/ml}$ C + 12,5 $\mu\text{g/ml}$ O ; 12,5 $\mu\text{g/ml}$ C + 12,5 $\mu\text{g/ml}$ T; 12,5 $\mu\text{g/ml}$ C + 12,5 $\mu\text{g/ml}$ O + 12,5 $\mu\text{g/ml}$ T), et en l'absence ou en la présence de 10^{-10} M d'IL-1 β porcine recombinante. Les chondrocytes étaient incubés pendant 24 ou 48 h avec les actifs nutritionnels et/ou l'IL-1 β (Figure 24). Chaque condition de culture était testée en triplicata dans trois cultures de chondrocytes indépendantes.

Phase 1 : sélection des actifs nutritionnels

Protocole 1 : IL-1 β et actifs nutritionnels ajoutés simultanément (n=2 cultures)

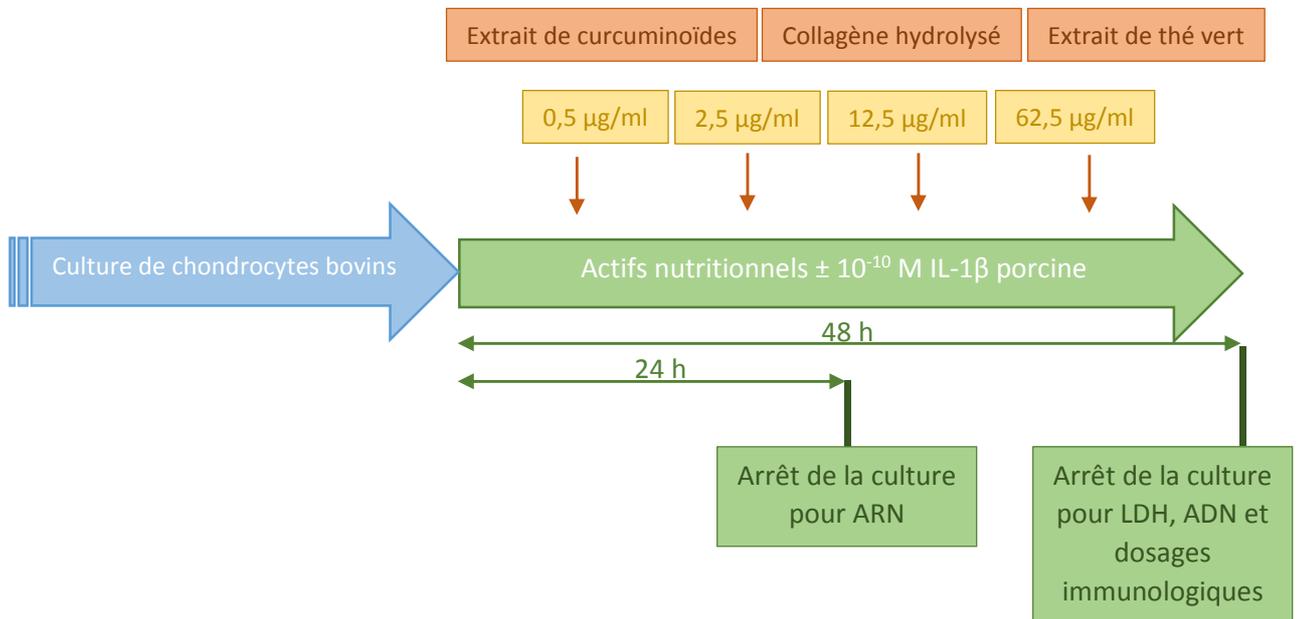


Protocole 2 : pré-incubation avec les actifs nutritionnels avant l'IL-1 β (n=1 culture)



Phase 2 : identification de la concentration optimale en actifs nutritionnels

Protocole 3 : IL-1 β incubé simultanément avec des doses croissantes d'actifs nutritionnels (n = 3 cultures)



Phase 3 : recherche des effets additifs ou synergiques des actifs nutritionnels

Protocole 4 : IL-1 β et, seuls ou en mélange, incubés simultanément (n = 3 cultures)

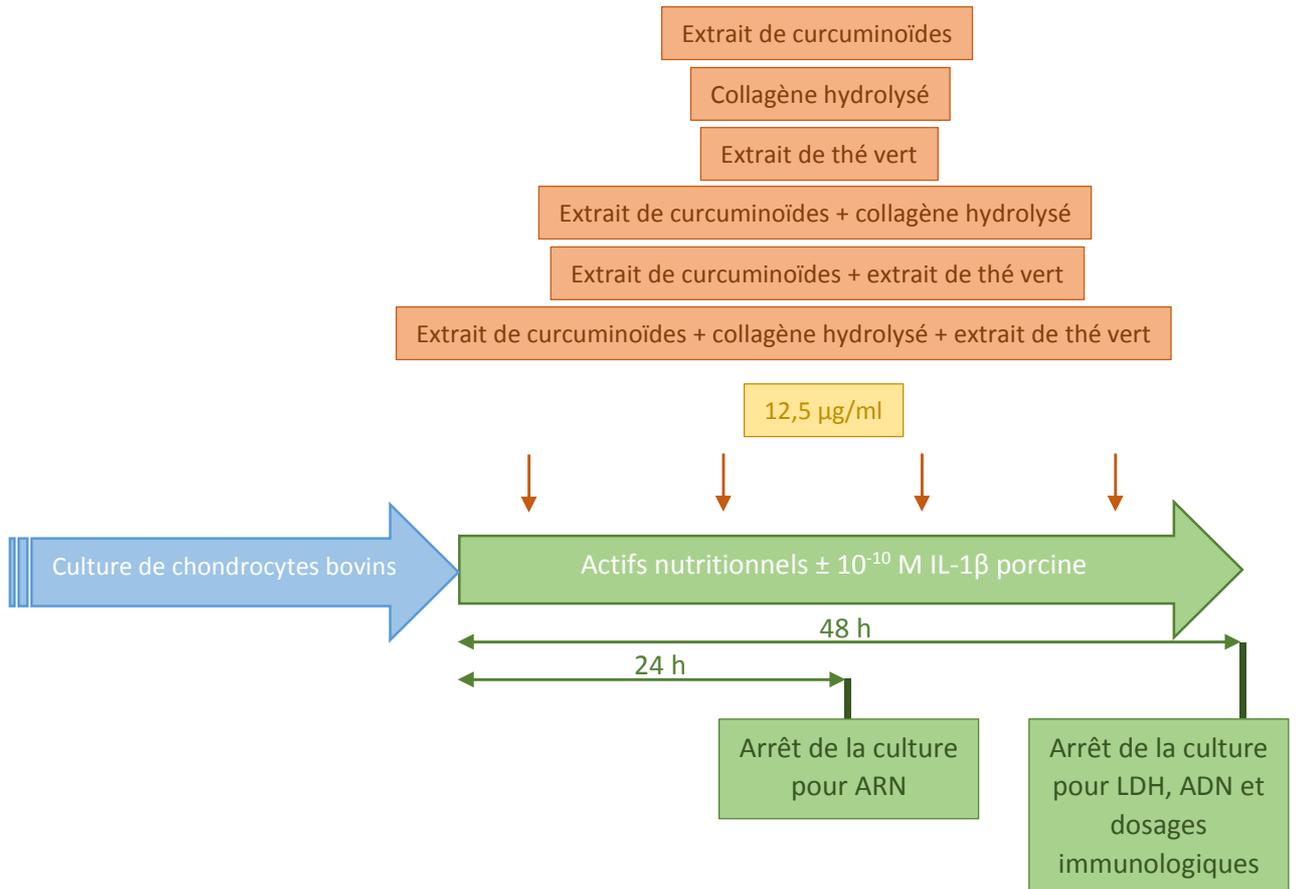
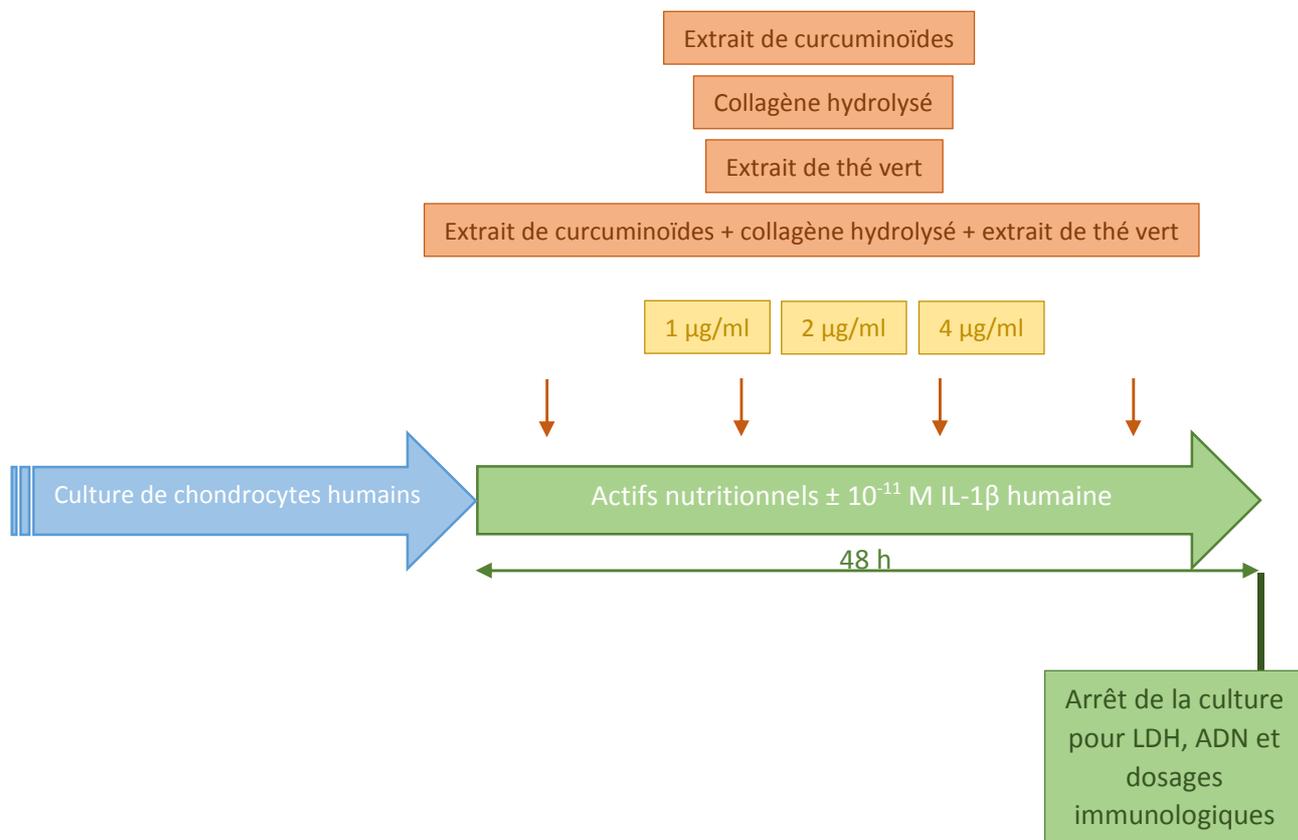


Figure 24. Représentation schématique des différents protocoles réalisés sur les chondrocytes bovins.

Quand les chondrocytes humains atteignaient environ 95 % de confluence, le milieu de culture était enlevé et remplacé par du milieu de culture frais contenant les trois actifs nutritionnels seuls ou en combinaison, à des concentrations variant de 1 à 4 µg/ml (1-2-4 µg/ml C, 1-2-4 µg/ml O, 1-2-4 µg/ml T) et en absence ou en présence de 10^{-11} M d'IL-1β humaine (R&D System, Abingdon, Royaume-Uni). Les chondrocytes étaient incubés pendant 24 ou 48 h avec les actifs nutritionnels et/ou l'IL-1β. Chaque condition de culture était testée en triplicata dans trois cultures de chondrocytes indépendantes. Afin d'investiguer les effets des actifs nutritionnels sur la voie de signalisation NF-κB activée par l'IL-1β, les chondrocytes humains arthrosiques étaient pré-incubés pendant 24 h avec 4 µg/ml de C ou avec la combinaison COT (4 µg/ml de C + 4 µg/ml de O + 4 µg/ml de T), puis stimulés par l'IL-1β humaine 10^{-11} M pendant 5 ou 15 min.

Pour la réalisation de la technique des biopuces à ADN, des chondrocytes primaires humains ont été isolés à partir de cartilage arthrosique (dix femmes et deux hommes, âge moyen de 67 ans, variant de 54 à 76 ans) prélevé au niveau du genou lors la pose d'une prothèse du genou. Douze cultures indépendantes, réalisées avec des chondrocytes provenant de patients différents, ont été utilisées. Les chondrocytes étaient cultivés en monocouche dans les conditions expérimentales décrites précédemment. Quand les chondrocytes humains atteignaient 95 % de confluence, la combinaison COT était ajoutée au milieu de culture avec ou sans IL-1β humaine à la concentration de 10^{-11} M. Les chondrocytes étaient cultivés pendant 24 ou 48 h avec le mélange COT et/ou l'IL-1β (Figure 25).

Phase 4 : phase confirmatoire

Protocole 5 : IL-1 β et actifs nutritionnels ajoutés simultanément (n = 3 cultures)

Phase 5 : phase mécanistique

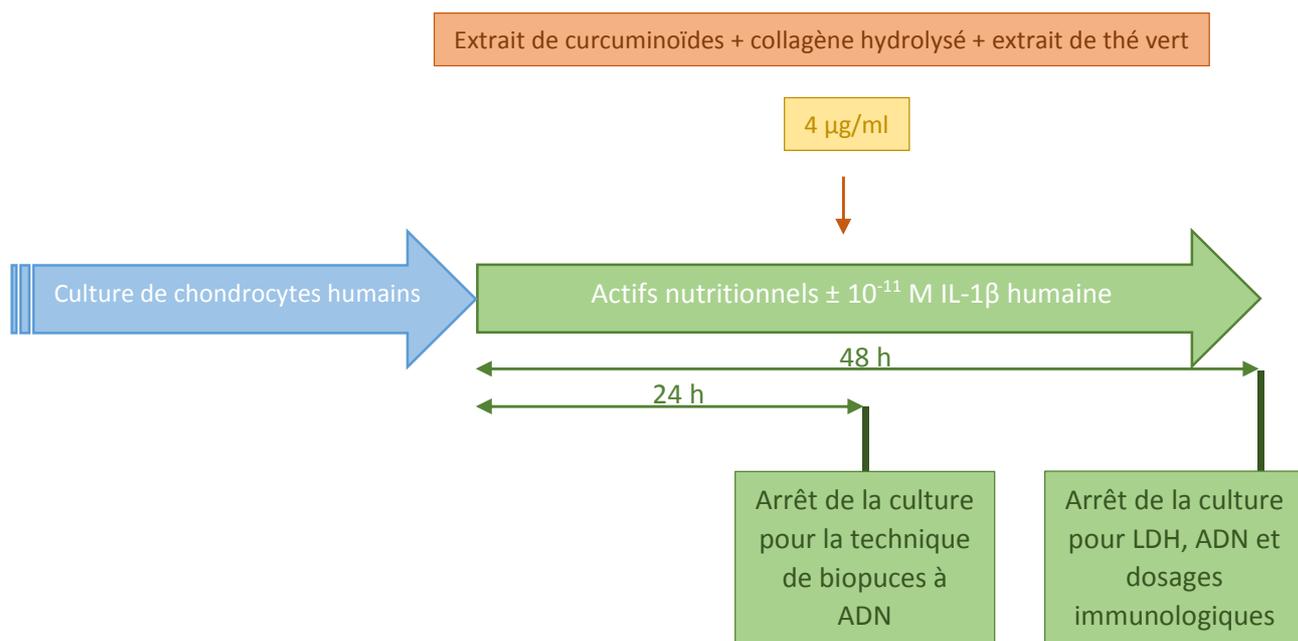
Protocole 6 : IL-1 β et actifs nutritionnels ajoutés simultanément (n = 12 cultures)

Figure 25. Représentation schématique des différents protocoles réalisés sur les chondrocytes humains.

3.2.5 Arrêt de la culture des chondrocytes

Après 24 h de culture en présence des actifs nutritionnels et/ou de l'IL-1 β , le milieu de culture conditionné était collecté et stocké à -20 °C. Les chondrocytes étaient récoltés à l'aide d'un scrappeur. L'acide ribonucléique (ARN) était extrait en utilisant le RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) et une réaction de polymérisation en chaîne (transcriptase inverse puis quantitative) était réalisée pour analyser l'expression des gènes.

Après 48 h de culture en présence des actifs nutritionnels et/ou de l'IL-1 β , le milieu de culture conditionné (de l'autre moitié des puits) était collecté et stocké à - 20 °C. Les chondrocytes étaient lysés par ultrasons (50 Hz) pendant 20 sec à 4 °C dans 500 μ l de tampon Tris-HCl.

3.2.6 Mesure de la lactate déshydrogénase

La viabilité cellulaire était estimée en quantifiant la lactate déshydrogénase (LDH) dans les milieux de culture conditionnés. Un échantillon de 100 μ l des milieux de culture conditionnés ou de la courbe de dilution du standard (LDH de muscle de lapin, gamme de concentrations comprise entre 12,5 et 2000 ng/ml) (Roche, Bruxelles, Belgique) était mélangé avec 50 μ l de tampon Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) contenant 0,1 % d'albumine sérique de bœuf (BSA) et 800 mM de lactate (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). Ensuite, 50 μ l du réactif colorimétrique (1,6 mg/ml de chlorure de p-iodonitrotetrazolium (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), 4 mg/ml de nicotinamide-adénine dinucléotide (Roche, Bruxelles, Belgique), et 0,4 mg/ml de méthosulfate de phénazine (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)) étaient ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance était lue à une longueur d'onde de 492 nm à l'aide du spectrophotomètre Labsystems iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finlande). Le pourcentage de cellules mortes était calculé en utilisant la formule suivante : LDH du surnageant de culture / (LDH du surnageant de culture + LDH des extraits cellulaires) x 100.

3.2.7 Réaction de polymérisation en chaîne

L'ARN était transcrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à l'enzyme SuperScript III (Life Technologies, Gand, Belgique). Une réaction de polymérisation en

chaîne quantitative (qPCR) était ensuite réalisée pour analyser l'expression des gènes, en utilisant le SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Westburg, Leusden, Pays-Bas) comme précédemment décrit [84]. La source d'acide nucléique pour la réaction de polymérisation en chaîne était soit l'ADNc des échantillons, soit de l'ADN standard purifié dont la concentration était connue. Les séquences des primers utilisées pour amplifier l'ADNc désiré ont été présentées dans le Tableau 5. L'amplification était réalisée avec le LightCycler 480 (Roche, Bruxelles, Belgique). Pour standardiser les niveaux d'ARNm, l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) a été amplifiée et utilisée comme gène de référence (contrôle interne). L'expression des gènes était normalisée en calculant le rapport entre le nombre de copies d'ADNc d'IL-6, COX2, iNOS, MMP-3, ADAMTS4, ADAMTS5, collagène de type II (COL2), AGG et le nombre de copies d'ADNc d'HPRT.

Tableau 5. Séquences des primers bovins sens et anti-sens utilisés pour la qPCR.

Gene	Primer bovin sens	Primer bovin anti-sens
HPRT	5'-AGTTTGGAAATACCTGGCG-3'	5'-AGTCTTTAGGCTCGTAGTGC-3'
IL-6	5'-TGGTGATGACTTCTGCTTCC-3'	5'-TGCCAGTGTCTCCTTGC-3'
COX2	5'-GTCTGATGATGTATGCCACC-3'	5'-ACGTAGTCTTCAATCACAATCT-3'
iNOS	5'-GGCAAGCACCACATTGAGA-3'	5'-TGCGGCTGGATTCGGA-3'
MMP-3	5'-TCTATGAAGGAGAAGCTGACATAAT-3'	5'-TTCATGGGCAGCAACAAG-3'
ADAMTS 4	5'-CTTCAATGTCCCACAGGC-3'	5'-CAGGAACGGAAGCGGGTA-3'
ADAMTS 5	5'-GACACCCTGGGAATGGCA-3'	5'-CACAGAACTTGGAAATCGTCA-3'
COL2	5'-CTGCGTCTACCCCAAC-3'	5'-GGGTGCAATGTCAATGAT-3'
AGG	5'-TGCCTTTGACGTGAGC-3'	5'-GCATTGTTGTTGACAAACT-3'

HPRT=hypoxanthine phosphoribosyltransférase, IL-6=interleukine-6, COX2=cyclooxygénase 2, iNOS=synthase d'oxyde nitrique inductible, MMP-3=metalloprotéase matricielle-3, ADAMTS4=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 4*, ADAMTS5=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 5*, COL2=collagène de type II, AGG=agrécane

3.2.8 Analyse génétique sur biopuces à ADN

Le rendement de l'extraction d'ARN était déterminé de manière spectrophotométrique en mesurant la densité optique à 260 nm. La pureté et la qualité de l'ARN étaient évaluées en utilisant un kit Experion RNA StdSens Analysis (Bio-Rad, Temse, Belgique).

Le profil d'expression des gènes était réalisé en utilisant une puce (Illumina multisample format Human HT-12 v4 Bead-Chip) (Illumina, Eindhoven, Pays-Bas) qui

contient plus de 34000 sondes. Pour chaque échantillon, 250 ng d'ARN total était marqué à la biotine en utilisant la trousse « Illumina TotalPrep-96 RNA Amplification » (Ambion, Erembodegem, Belgique). L'ARN marqué était hybridé à la puce. Les puces étaient lavées, puis scannées en utilisant un « BeadArray Reader » (Illumina, Eindhoven, Pays-Bas). Les images brutes de l'analyse étaient enregistrées et extraites automatiquement durant le scan par le logiciel GenomeStudio (Illumina, Eindhoven, Pays-Bas) (Figure 26).

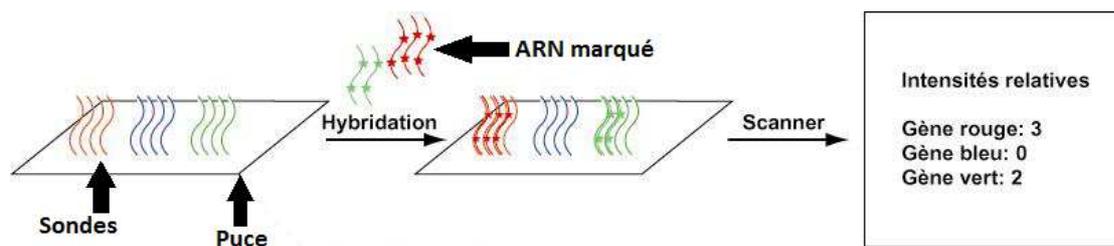


Figure 26. Schéma représentant le principe de la technique des biopuces à ADN.

Les données brutes obtenues étaient ensuite transférées au logiciel Biometric Research Branch (BRB) ArrayTools (disponible à l'adresse <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) pour être normalisées en utilisant la méthode de normalisation des quantiles selon les recommandations du fabricant. Les données normalisées étaient ensuite filtrées. Ce filtre permettait d'éliminer les transcrits non exprimés ou exprimés de la même manière.

L'outil de comparaison de classes du logiciel BRB ArrayTools calculait ensuite le nombre de gènes qui montraient une expression différentielle entre les conditions, à un niveau de signification statistique sélectionné ($p < 0,001$). Une liste de gènes était créée. La pertinence biologique des gènes sur- et sous-exprimés était analysée en utilisant le programme Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen, Venlo, Pays-Bas).

3.2.9 Mesure de l'acide désoxyribonucléique

Les chondrocytes étaient lysés par ultrasons (50 Hz) pendant 20 sec à 4 °C dans 500 μ l de tampon Tris-HCl. Le contenu en ADN était mesuré dans les extraits cellulaires en utilisant la méthode fluorométrique de Hoechst [269]. En bref, 200 μ l de la solution réactive (0,2 mg/ml solution Hoechst dye (Life Technologies, Gand, Belgique) diluée cent fois dans du tampon PO_4 50 mM) étaient ajoutés à 50 μ l des

extraits cellulaires ou de la courbe de dilution du standard (gamme de concentrations comprise entre 0,3125 et 20 $\mu\text{g/ml}$). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la fluorescence était lue à 458 nm à l'aide d'un fluorimètre Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finlande).

3.2.10 Mesure du nitrite

La production de NO était quantifiée en mesurant son produit dérivé, le nitrite (NO_2), dans les milieux de culture conditionnés en utilisant une méthode spectrophotométrique basée sur la réaction de Griess [270]. Cent μl des milieux de culture conditionnés ou de la courbe de dilution du standard (nitrite de sodium (NaNO_2), gamme de concentrations comprise entre 1,95 et 125 nmol/ml) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) étaient mélangés avec 100 μl du réactif de Griess (0,5 % sulfanilamide, 0,05 % naphthyle éthylène diamine, 2,5 % acide phosphorique (H_3PO_4)). L'absorption était mesurée à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide du spectrophotomètre Labsystems iEMS Reader MF. La production de NO_2 était exprimée par μg d'ADN.

3.2.11 Mesure de la prostaglandine E_2

La production de PGE_2 était mesurée dans les milieux de culture conditionnés en utilisant le dosage immunologique compétitif DetectX PGE_2 High Sensitivity Immunoassay (Arbor Assays, Michigan, États-Unis). En bref, 100 μl des milieux de culture conditionnés ou de la courbe de dilution du standard (PGE_2 , gamme de concentrations comprise entre 12,5 et 400 pg/ml) étaient déposés dans un puits d'une plaque 96 puits, dont la paroi était tapissée avec des anticorps anti-souris dirigés contre les Ig de type G. Une peroxydase conjuguée à la PGE_2 (25 μl) était ajoutée aux standards et aux milieux de culture conditionnés dans les puits. La réaction de liaison permettant la formation de complexes anticorps-antigène-anticorps était initiée par l'addition d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la PGE_2 (25 μl). Après une incubation d'une nuit à 4°C, la plaque était lavée et 100 μl de 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine et d' H_2O_2 (Biosource Europe, Fleurus, Belgique) étaient ajoutés pour permettre la révélation de la formation du complexe. Ce substrat réagissait grâce à la liaison avec la peroxydase conjuguée à la

PGE₂, ajoutée précédemment aux puits. Après une période de 30 min d'incubation, la réaction était arrêtée par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1,8 N. L'absorbance était mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide du spectrophotomètre Labsystems iEMS Reader MF. La production de PGE₂ était exprimée par µg d'ADN.

3.2.12 Dosages immunologiques (EASIA) de l'agrécane, de la *bone morphogenetic protein-2*, du ligand à la chimiokine (motif C-X-C) 6, de l'interleukine-6, de la métalloprotéase matricielle-3 et -13, de la stanniocalcine 1 et de la serpine E1

Les productions d'AGG, *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), CXCL6, IL-6, MMP-3, MMP-13, STC1 et serpine E1 ont été mesurées par EASIA (*enzyme amplified sensitivity immunoassay*) (Tableau 6). Les EASIA ont été réalisés selon les protocoles décrits par les fabricants (IL-6, MMP-3, AGG : Invitrogen, Merelbeke, Belgique ; CXCL6, MMP-13, BMP-2, STC1, serpine E1: R&D Systems, Abingdon, Royaume-Uni). Les productions de BMP-2, CXCL6, IL-6, MMP-3, MMP-13, STC1 et serpine E1 étaient mesurées dans les surnageants de culture alors que la production d'AGG était mesurée dans les surnageants de culture et dans les extraits cellulaires. Ces dosages étaient basés sur un système constitué de deux anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes distincts de la molécule à quantifier. Le premier anticorps était fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits par une incubation durant une nuit à 4°C. La plaque était alors lavée et ensuite saturée avec une solution de BSA durant 2 h à température ambiante. L'antigène réagissait avec l'anticorps fixé sur le fond du puits et avec l'anticorps couplé à de la biotine. Après une période d'incubation de 2 h permettant la formation de complexes anticorps-antigène-anticorps biotinylé, la plaque était lavée. Une solution de 0,02 U/ml de streptavidine-peroxydase (Roche, Bruxelles, Belgique), préparée dans le tampon utilisé pour la saturation des plaques, était ajoutée. Au terme de 30 min d'incubation, la plaque était lavée et la révélation des anticorps fixés aux antigènes était effectuée par l'addition d'une solution de 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et d'H₂O₂. Après une période de 20 min d'incubation, la réaction était arrêtée par l'ajout d'une solution d'H₂SO₄ 1,8 N.

L'absorbance était mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide du spectrophotomètre Labsystems iEMS Reader MF. Les résultats étaient normalisés en rapportant les concentrations à la quantité d'ADN cellulaire, et donc exprimés par μg d'ADN.

Tableau 6. Caractéristiques spécifiques des différents dosages immunologiques réalisés.

	Sensibilité	Précision (CV intra-test)	Reproductibilité (CV inter-test)
AGG	0,9 ng/ml	2,7 %	4,0 %
BMP-2	11 pg/ml	2,6 %	6,3 %
IL-6	2 pg/ml	4,2 %	4,4 %
CXCL6	1,6 pg/ml	5,4 %	7,4 %
MMP-3	0,2 ng/ml	5,6 %	6,5 %
MMP-13	7,7 pg/ml	3,6 %	4,2 %
STC1	57 pg/ml	5,7 %	5,9 %
Serpine E1	0,059 ng/ml	6,8 %	7,0 %

CV=coefficient de variation

Remarques :

- Pour le dosage de l'AGG, l'anticorps fixé à la plaque reconnaît les résidus « Kératane Sulfate » et l'anticorps biotinylé reconnaît la partie « Hyaluronic Acid Binding Region » de la protéine centrale. Par conséquent, ce dosage permet la reconnaissance de la protéine entière, mais également de la protéine après clivage enzymatique.
- Pour le dosage de la MMP-3, les anticorps reconnaissent la MMP-3 active, la pro-MMP-3 et les complexes MMP-3/ TIMP.

3.2.13 Mesure des protéines totales

Les protéines totales étaient quantifiées dans les culots cellulaires en utilisant le kit MicroBCA (bicinchoninic acid) TM Protein (Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgique). Il se basait sur la réaction colorimétrique en présence d'acide bicinchoninique, utilisé comme agent de détection du Cu^+ . Celui-ci était formé lorsque le Cu^{++} était réduit par les protéines dans un environnement alcalin. La chélation de deux molécules d'acide bicinchoninique avec un ion Cu^+ permettait d'obtenir un produit de réaction de couleur mauve. La courbe de référence était réalisée à partir de BSA 2 mg/ml dans une gamme de concentrations comprise entre 6,25 et 400 $\mu\text{g/ml}$. Cent μl de la solution de réaction contenant l'acide bicinchoninique étaient ajoutés à 100 μl d'échantillons ou de standards. Après 1 h

d'incubation à 37°C et sous agitation, l'absorbance était lue à une longueur d'onde de 562 nm à l'aide du spectrophotomètre Labsystems iEMS Reader MF. La quantité de protéines totales était exprimée en µg/ml.

3.2.14 Immunotransfert de protéines

Les cellules étaient collectées, déposées sur la glace et lysées dans 50 µl de tampon (25 mM HEPES, 150 mM chlorure de sodium (NaCl), 0,5 % Triton X-100, 10 % glycérol et 1 mM dithiothreitol) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche, Bruxelles, Belgique). Après une incubation à 4 °C pendant 30 min, les lysats étaient centrifugés à 14000 g pendant 30 min à 4 °C, afin d'enlever les résidus insolubles. Les concentrations protéiques étaient déterminées en utilisant le kit MicroBCA dont le principe est décrit dans le paragraphe précédent. Les extraits protéiques totaux (20 µg) étaient fractionnés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (10 %) et transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène. Les membranes étaient bloquées pendant 1 h dans une solution saline tamponnée Tris-Tween contenant 5 % de lait en poudre (protéine *heat shock cognate* (HSC) 70) ou 2 % de BSA (phospho-NF-κB p65 et phospho-IκBα). Les membranes étaient ensuite incubées pour la nuit à 4 °C avec les anticorps primaires anti-lapin. Les anticorps anti-lapin phospho-NF-κB p65 (dilution 1:1000), anti-lapin phospho-IκBα (dilution 1:1000) et anti-lapin HSC70 (dilution 1:1000) (Cell Signaling, Boston, États-Unis) étaient utilisés. L'anticorps anti-lapin IgG lié à la peroxydase *horse-radish* (HRP) (dilution 1:2000) était utilisé comme anticorps secondaire (Cell Signaling, Boston, États-Unis). La réaction était révélée avec le substrat pour chimioluminescence améliorée pour immunotransfert de protéines (Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgique).

3.2.15 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism version 6. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± erreur type (SEM). Le test de normalité D'Agostino et Pearson était réalisé pour apprécier la distribution normale de l'échantillon. Afin de comparer toutes les conditions entre elles, la signification statistique était évaluée en utilisant une ANOVA. Ensuite, si celle-ci était

significative, un post-test de comparaison multiple de Dunnett était réalisé pour comparer les différentes conditions de l'expérience à une condition de référence (contrôle=ctrl). Pour comparer toutes les conditions entre elles, un post-test de Tukey était réalisé. Les analyses ne présentant que des résultats avec deux conditions expérimentales ont été comparées avec un test t de Student. Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives lorsque la p-valeur (p) était inférieure à 0,05.

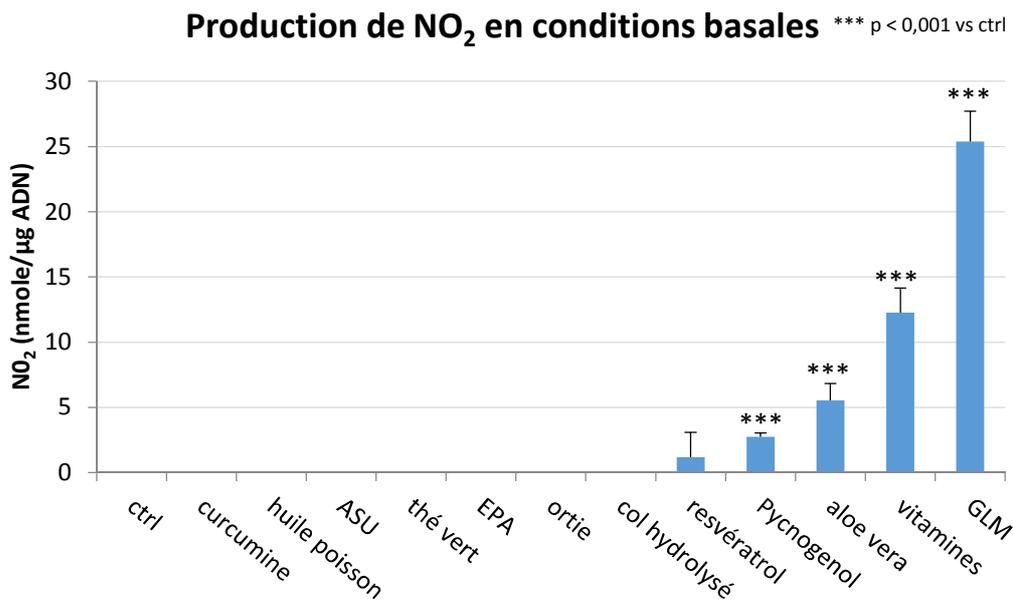
3.3 Résultats

3.3.1 Étude comparative des effets des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes bovins

3.3.1.1 Les paramètres inflammatoires

3.3.1.1.1 Production de nitrite

En l'absence d'IL-1 β , la production de NO₂ dans le ctrl était indétectable. Par contre, la production de NO₂ était augmentée et détectable en présence de l'aloë vera à 100 μ g/ml ($p < 0,001$ pour la culture 1 et $p = 0,024$ pour la culture 2), du pycnogénol à 25 μ g/ml, du mélange de vitamines à 184,58 μ g/ml et de la GLM à 180 μ g/ml ($p < 0,001$ dans les deux cultures). Les autres actifs nutritionnels ne modifiaient pas significativement la production de NO₂ (Figure 27).



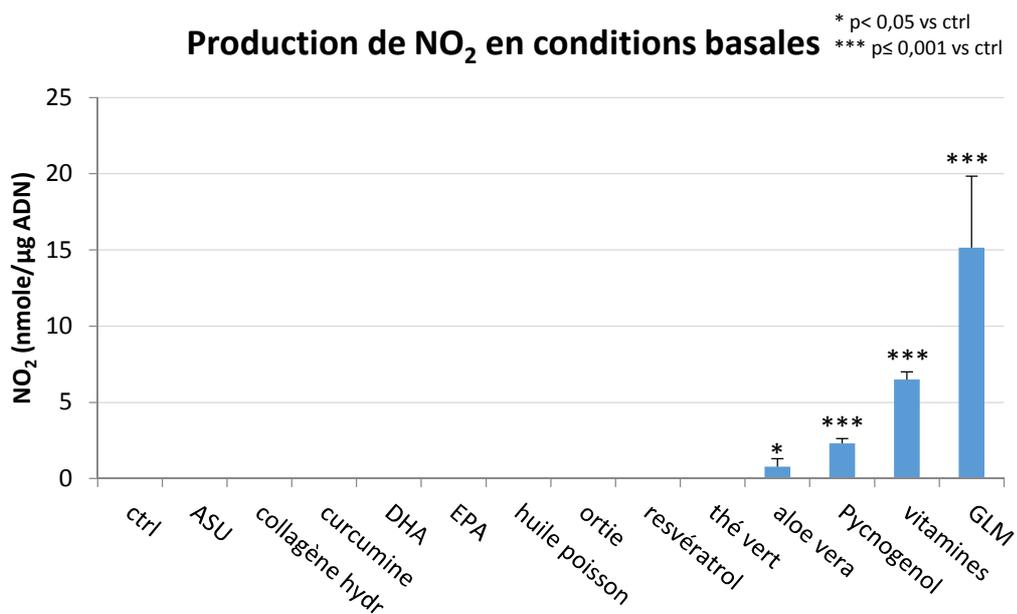


Figure 27. Production de NO₂ par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β stimulait la production de NO₂ par les chondrocytes bovins (19,11 \pm 6,36 nmole/ μ g d'ADN en présence d'IL-1 β) alors que la production de NO₂ en l'absence d'IL1 β était sous la limite de détection du test. En présence d'IL-1 β , l'extrait de curcuminoïdes à 3,68 μ g/ml diminuait significativement la production de NO₂ (p=0,013) tandis que l'aloë vera à 100 μ g/ml (p=0,042), le DHA à 3,28 μ g/ml (p<0,001), l'EPA à 3,02 μ g/ml (p=0,024), le collagène hydrolysé à 33 μ g/ml (p=0,005), l'extrait d'ortie à 10 μ g/ml (p=0,02) et le mélange de vitamines à 184,58 μ g/ml (p=0,025) augmentaient significativement le taux de NO₂, lorsque les actifs étaient co-incubés avec l'IL-1 β (Figure 28).

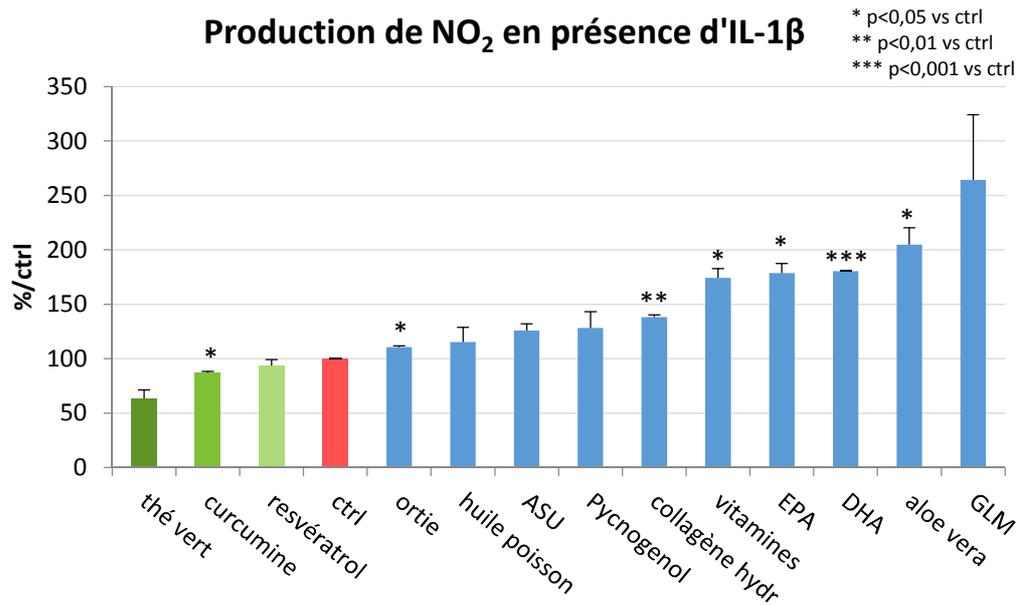


Figure 28. Production de NO₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

Une pré-incubation de 48 h avec GLM à 180 μ g/ml diminuait significativement l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de NO₂ ($p=0,001$). Le pycnogénol à 25 μ g/ml, le mélange de vitamines à 184,58 μ g/ml, l'extrait de curcuminoïdes à 3,68 μ g/ml, l'extrait de thé vert à 49,29 μ g/ml, le resvératrol à 2,28 μ g/ml, l'huile de poisson à 77,5 μ g/ml, l'extrait d'ortie à 10 μ g/ml et le DHA à 3,28 μ g/ml n'avaient pas d'effet significatif alors que les ASU à 10 μ g/ml ($p=0,047$), l'EPA à 3,02 μ g/ml ($p=0,012$), le collagène hydrolysé à 33 μ g/ml ($p=0,018$) et l'aloë vera à 100 μ g/ml ($p=0,047$) augmentaient significativement la production de NO₂ (Figure 29).

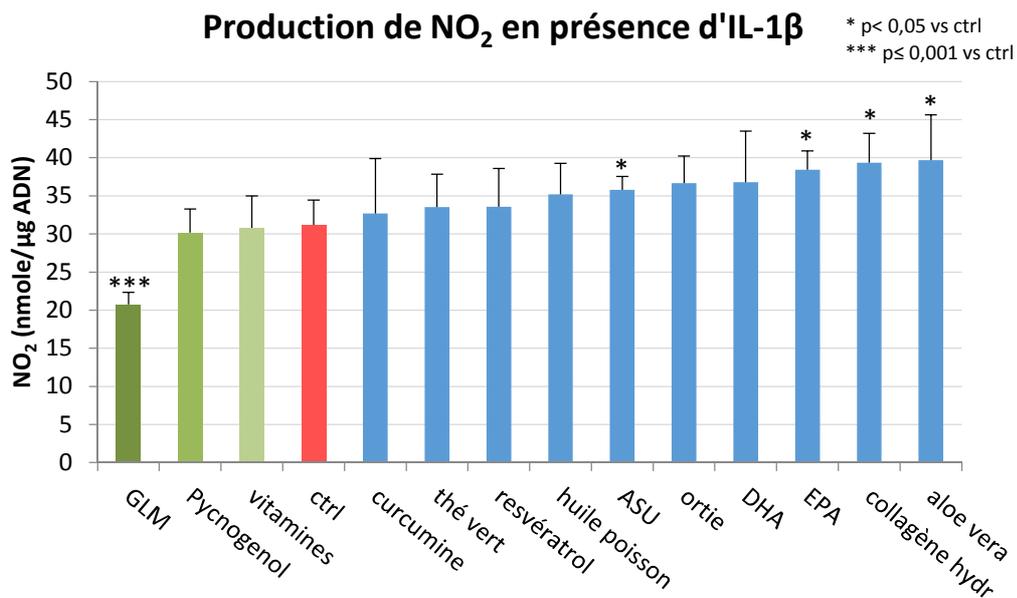


Figure 29. Production de NO₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , pré-incubés pendant 48 h avec l'aloe vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.1.2 Production de prostaglandine E₂

En l'absence d'IL-1 β , la production de PGE₂ par les chondrocytes était extrêmement faible. À l'exception de l'aloe vera à 100 μ g/ml ($p=0,009$), de l'EPA à 3,02 μ g/ml ($p=0,004$) et du mélange de vitamines à 184,58 μ g/ml ($p=0,002$) qui augmentaient la production de PGE₂, les autres actifs nutritionnels ne modifiaient pas significativement la production de PGE₂ (Figure 30).

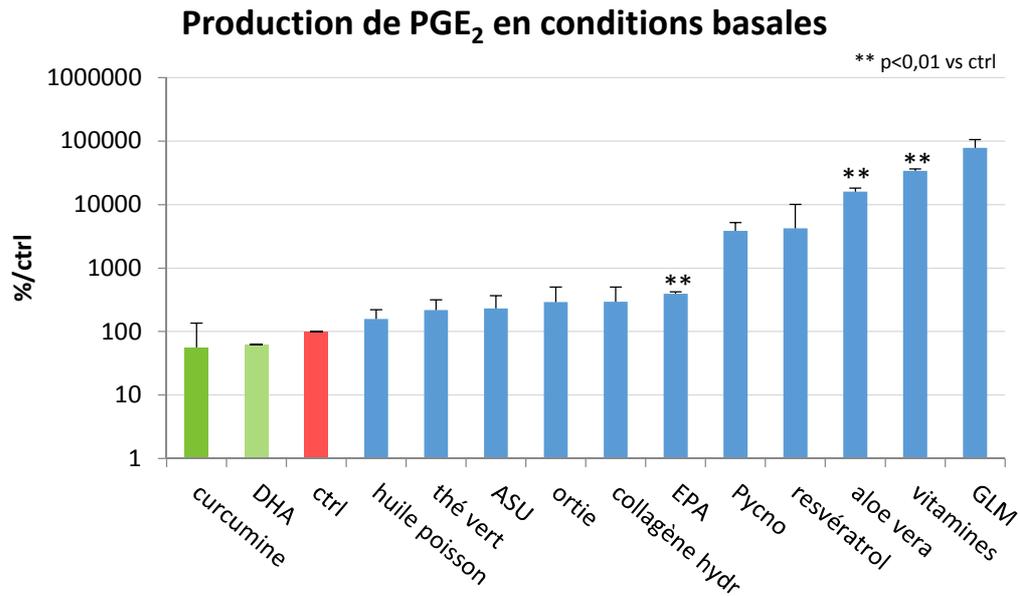


Figure 30. Production de PGE₂ par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β stimulait la production de PGE₂ par les chondrocytes (27138,2 \pm 14134,7 pg/ μ g d'ADN en présence d'IL-1 β versus 51,2 \pm 8,1 pg/ μ g d'ADN en l'absence d'IL1 β , p=0,013). En présence d'IL-1 β , le pycnogénol à 25 μ g/ml (p=0,027), le DHA à 3,28 μ g/ml (p=0,032) et l'extrait de thé vert à 49,29 μ g/ml (p=0,039) diminuaient significativement la production de PGE₂ (Figure 31).

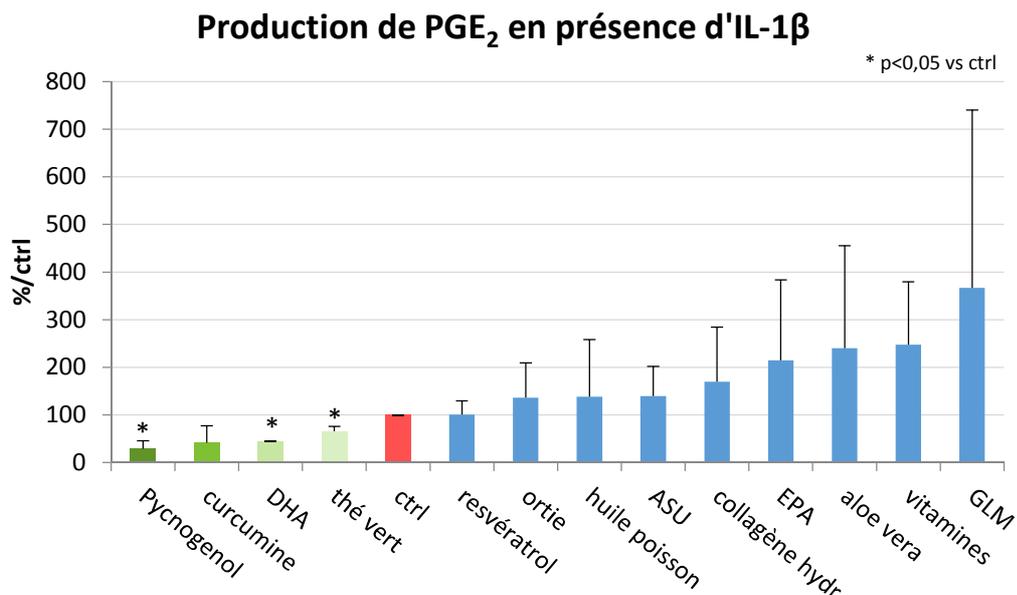


Figure 31. Production de PGE₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

Une pré-incubation de 48 h avec le mélange de vitamines à 184,58 μ g/ml ($p=0,031$) ou la GLM à 180 μ g/ml ($p=0,004$) accentuait significativement l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de PGE₂ (Figure 32). Les autres actifs nutritionnels n'avaient pas d'effet significatif.

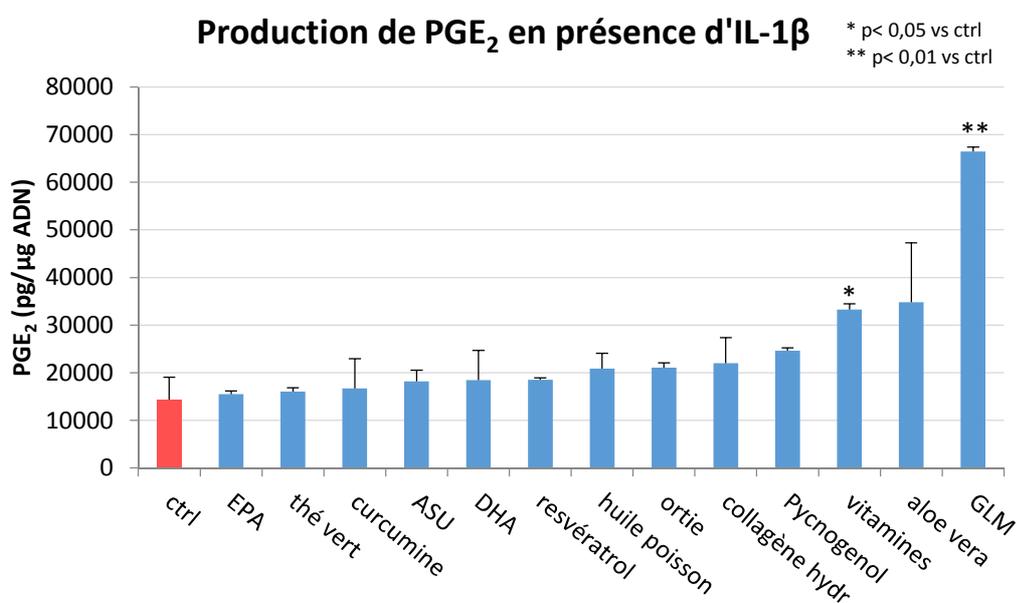


Figure 32. Production de PGE₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , pré-incubés pendant 48 h avec l'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.1.3 Expression du gène codant pour l'interleukine-6

En l'absence d'IL-1 β , les actifs nutritionnels ne modifiaient pas significativement l'expression d'IL-6, à l'exception de la GLM à 180 $\mu\text{g/ml}$ qui augmentait son expression ($p=0,006$) (Figure 33).

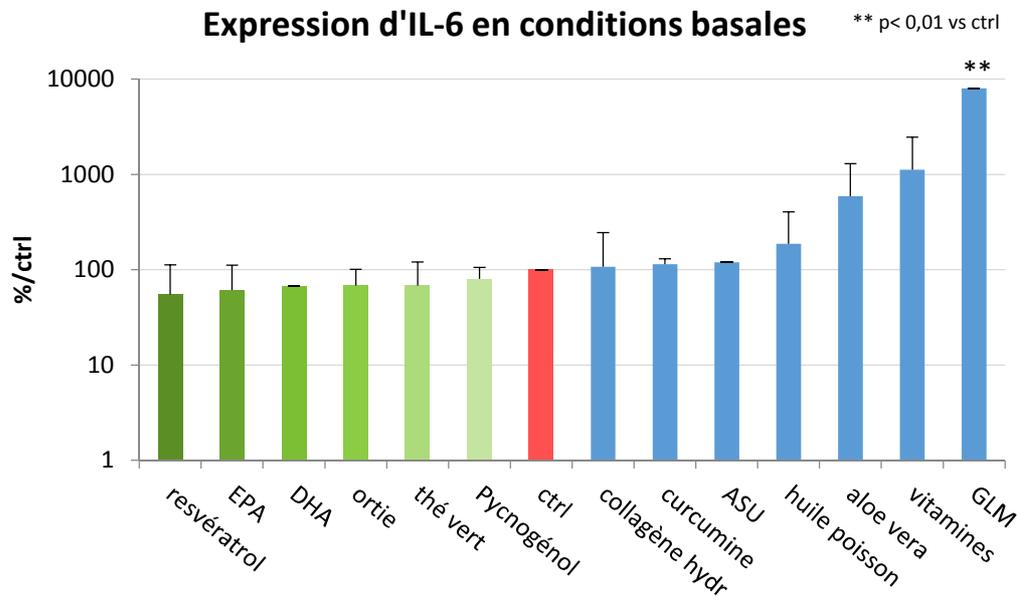


Figure 33. Expression d'IL-6 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β tendait à stimuler l'expression d'IL-6 par les chondrocytes ($12,6 \pm 8,2$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $1,2 \pm 0,3$ copies/HPRT en absence d'IL-1 β , $p=0,16$). L'extrait de curcuminoïdes à $3,68 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,002$) et le pycnogénol à $25 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,017$) diminuaient significativement l'expression d'IL-6 stimulée par l'IL-1 β (Figure 34).

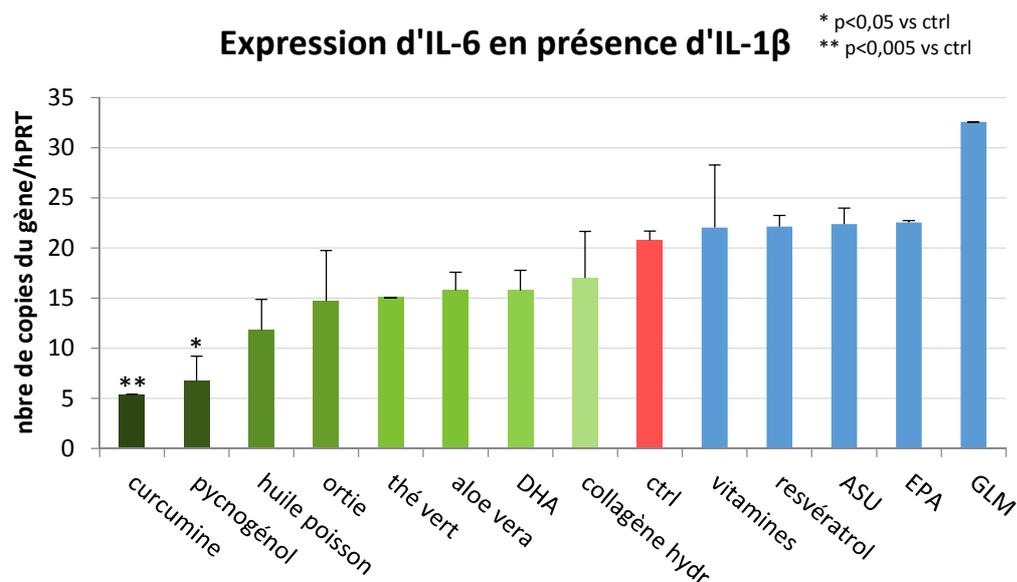


Figure 34. Expression d'IL-6 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénoles, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.1.4 Expression du gène codant pour la cyclooxygénase 2

En l'absence d'IL-1 β , le collagène hydrolysé à 33 μ g/ml ($p=0,015$) et l'extrait d'ortie à 10 μ g/ml ($p=0,002$) diminuaient significativement l'expression de COX2. Au contraire, la GLM augmentait significativement l'expression de COX2 ($p<0,001$) (Figure 35).

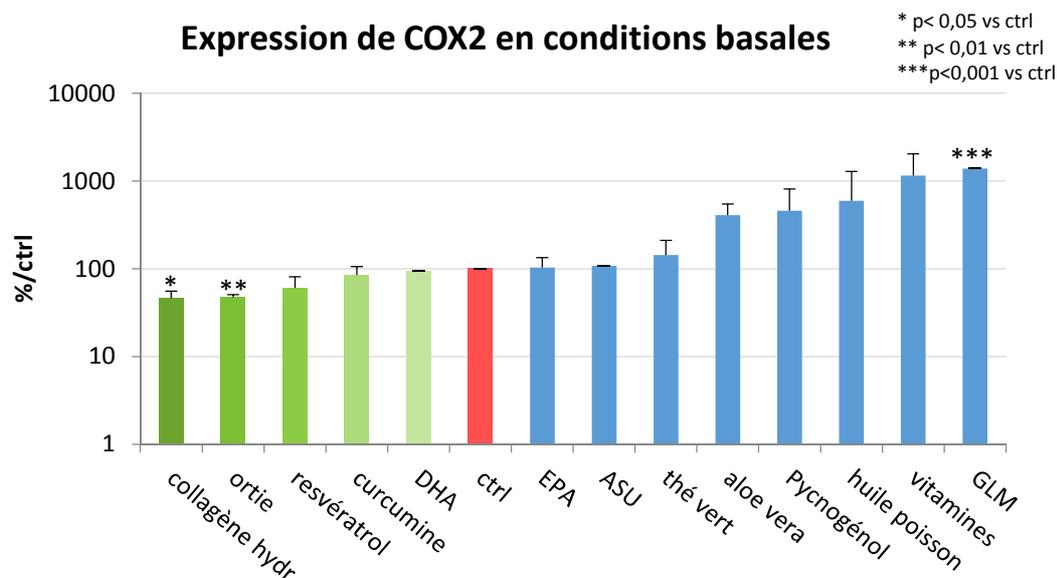


Figure 35. Expression de COX2 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénoles, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β tendait à stimuler l'expression de COX2 par les chondrocytes ($8,8 \pm 3,6$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $4,5 \pm 4,2$ copies/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,531$). Lors d'une stimulation à l'IL-1 β , le pycnogénol à 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,024$), l'extrait de curcuminoïdes à 3,68 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,022$), l'huile de poisson à 77,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,024$), l'aloë vera à 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,027$) et le DHA à 3,28 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,024$) diminuaient significativement l'expression de COX2 (Figure 36).

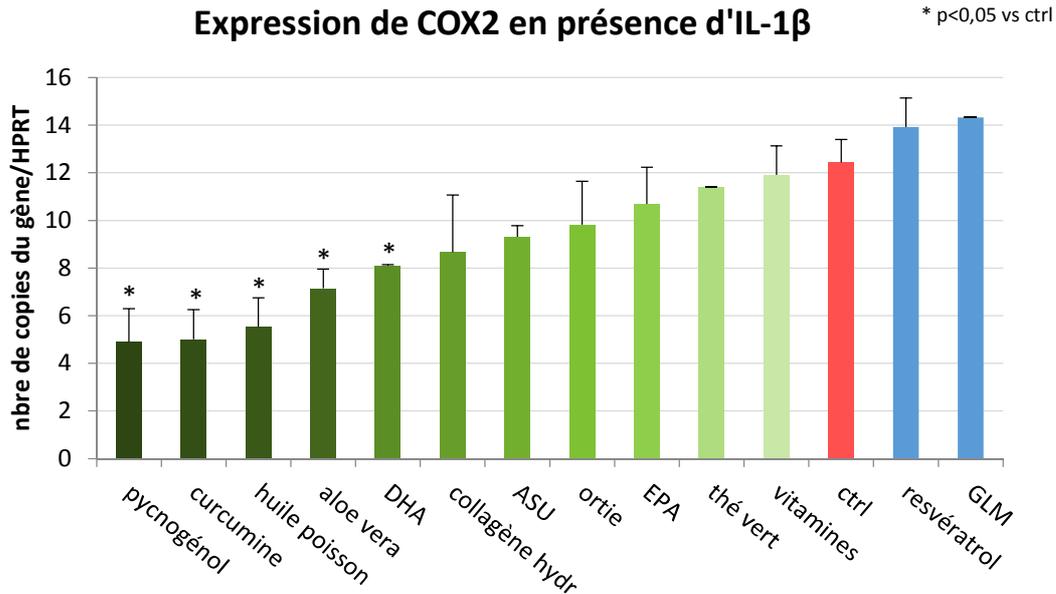


Figure 36. Expression de COX2 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.1.5 Expression du gène codant pour la synthèse d'oxyde nitrique inductible

En l'absence d'IL-1 β , l'extrait de thé vert à 49,29 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,009$), l'huile de poisson à 77,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) et la GLM à 180 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) augmentaient significativement l'expression d'iNOS (Figure 37).

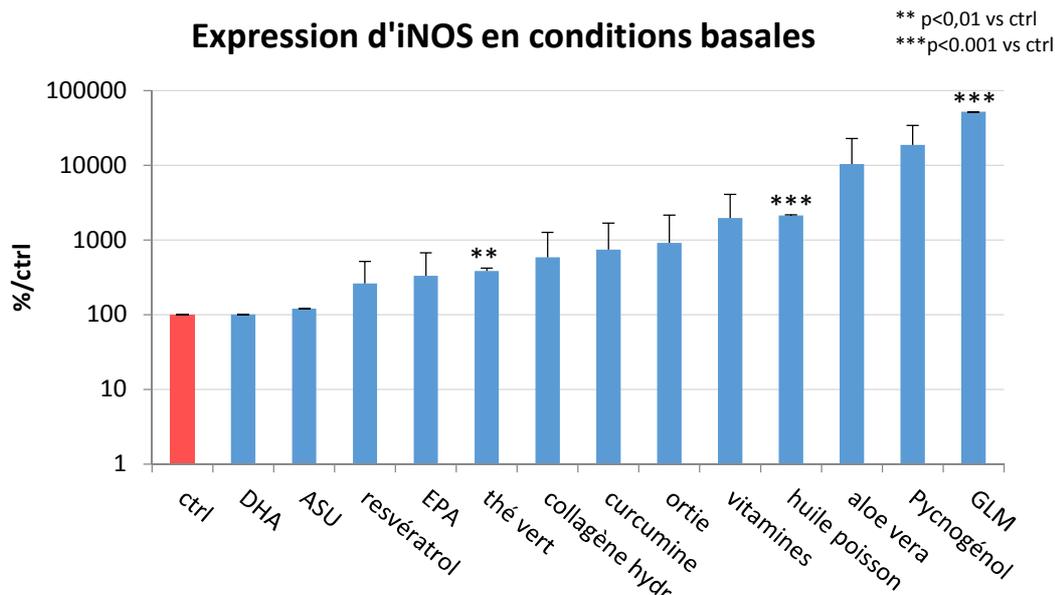


Figure 37. Expression d'iNOS par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β tendait à stimuler l'expression d'iNOS par les chondrocytes ($89,6 \pm 48,9$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $0,9 \pm 0,3$ copies/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,093$). Lors d'une stimulation à l'IL-1 β , le pycnogénol à 25 $\mu\text{g/ml}$ augmentait significativement l'expression d'iNOS ($p=0,046$) (Figure 38).

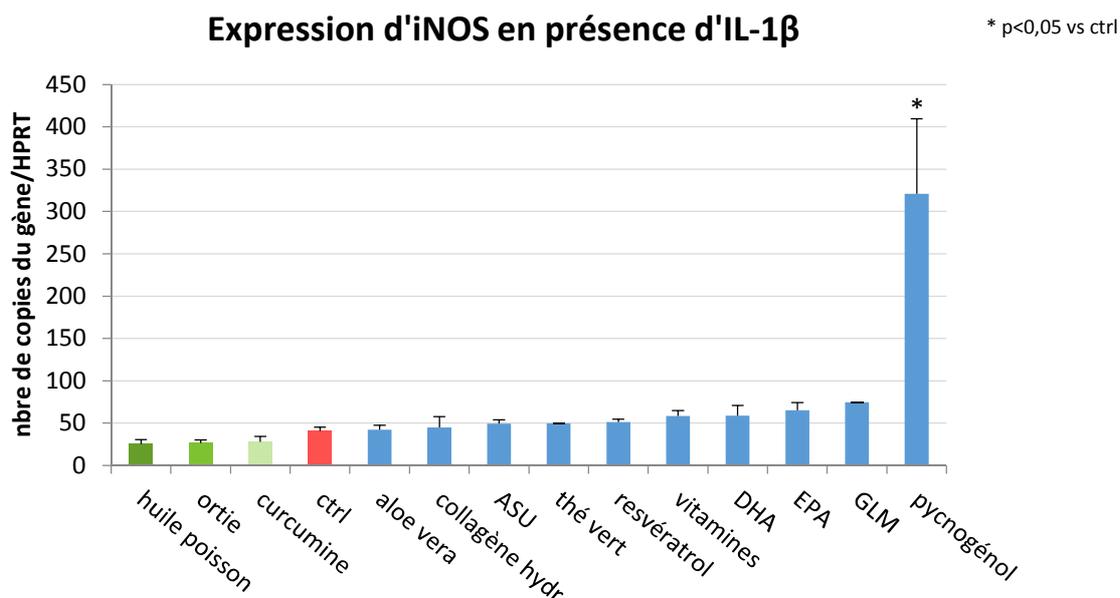


Figure 38. Expression d'iNOS par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.2 Les paramètres cataboliques

3.3.1.2.1 Expression du gène codant pour la métalloprotéase matricielle-3

En l'absence d'IL-1 β , le collagène hydrolysé à 33 μ g/ml diminuait significativement l'expression de MMP-3 ($p=0,001$). Par contre, la GLM à 180 μ g/ml augmentait significativement l'expression de MMP-3 ($p=0,004$) (Figure 39).

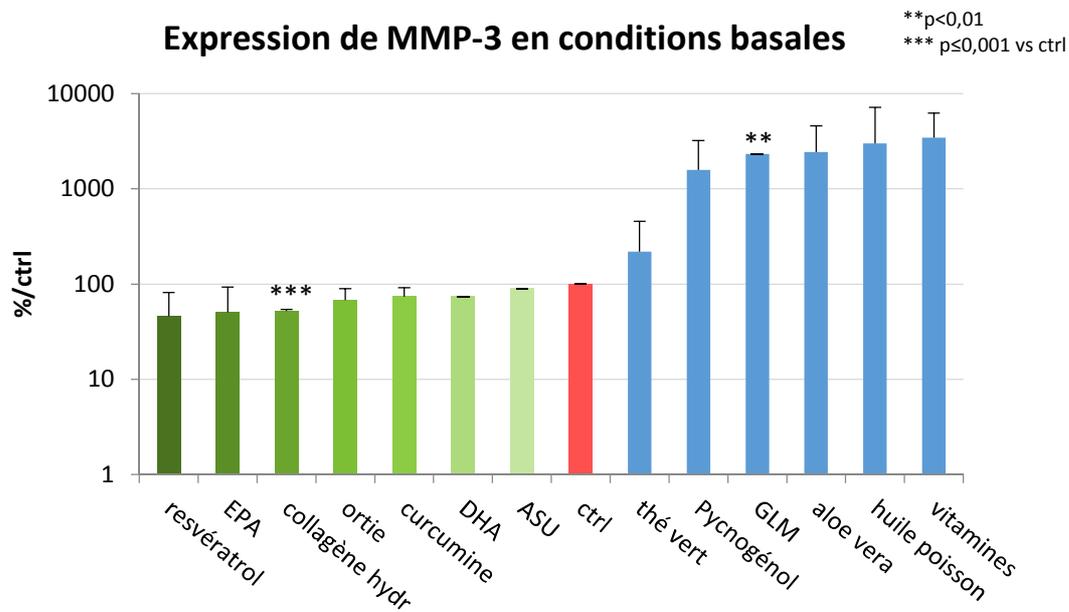


Figure 39. Expression de MMP-3 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β stimulait l'expression de MMP-3 par les chondrocytes ($180,5 \pm 72,5$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $11,6 \pm 10,7$ copies/HPRT en absence d'IL-1 β , $p=0,05$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , l'huile de poisson à 77,5 μ g/ml diminuait significativement l'expression de MMP-3 ($p=0,039$) (Figure 40).

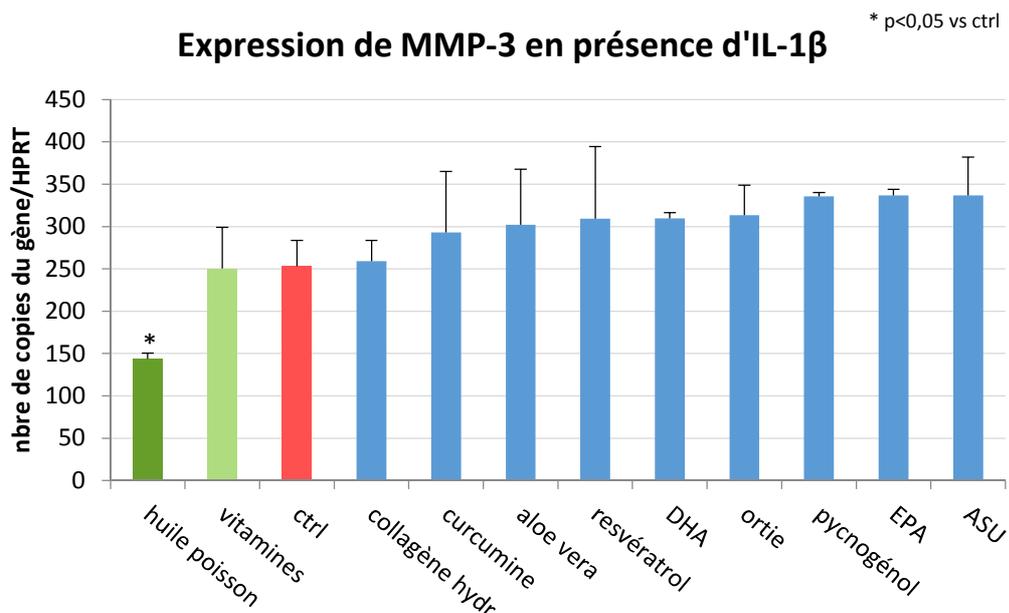


Figure 40. Expression de MMP-3 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogéno, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.2.2 Expression du gène codant pour l'aggrécanase 4

En l'absence d'IL-1 β , aucun actif ne diminuait significativement l'expression d'ADAMTS4. Par contre, la GLM à 180 μ g/ml augmentait significativement l'expression d'ADAMTS4 ($p < 0,001$) (Figure 41).

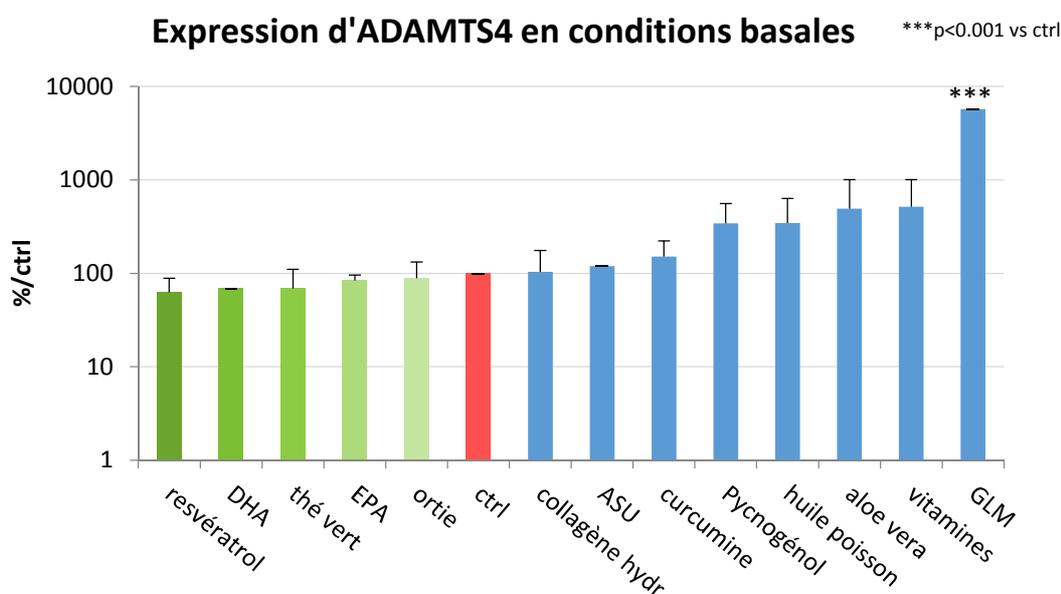


Figure 41. Expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogéno, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β stimulait de façon significative l'expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes ($7,7 \pm 0,05$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $0,4 \pm 0,06$ copies/HPRT en absence d'IL1 β , $p < 0,001$). Lors d'une stimulation à l'IL-1 β , les ASU à 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,011$), l'aloë vera à 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,023$) et le pycnogénol à 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) augmentaient l'expression des ADAMTS4 (Figure 42).

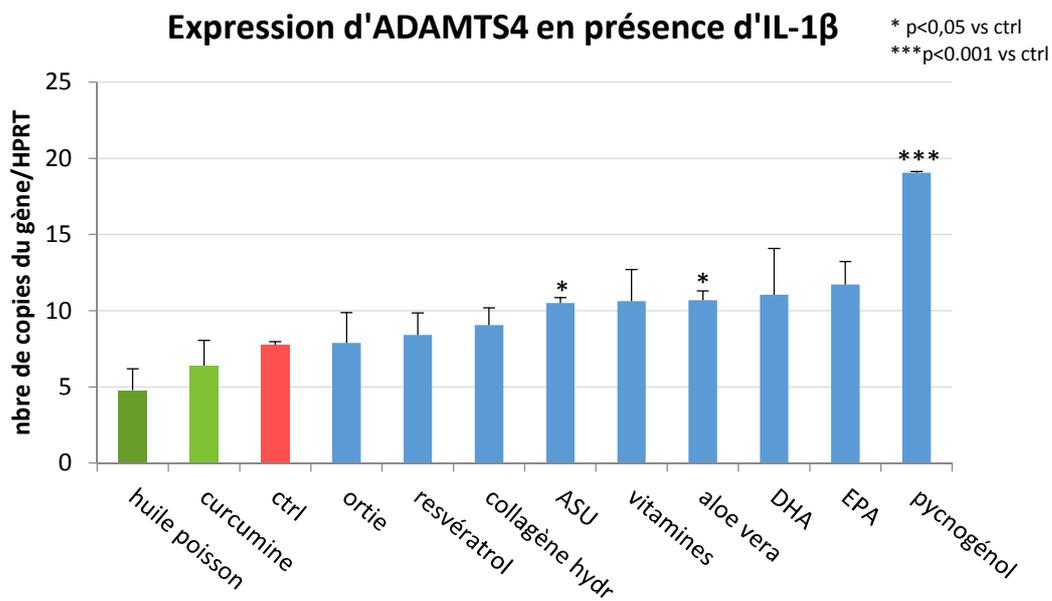


Figure 42. Expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.2.3 Expression du gène codant pour l'aggrecanase 5

En l'absence d'IL-1 β , les actifs nutritionnels ne modifiaient pas l'expression des ADAMTS5, à l'exception de la GLM à 180 $\mu\text{g/ml}$ qui augmentait significativement l'expression d'ADAMTS5 ($p = 0,003$) (Figure 43).

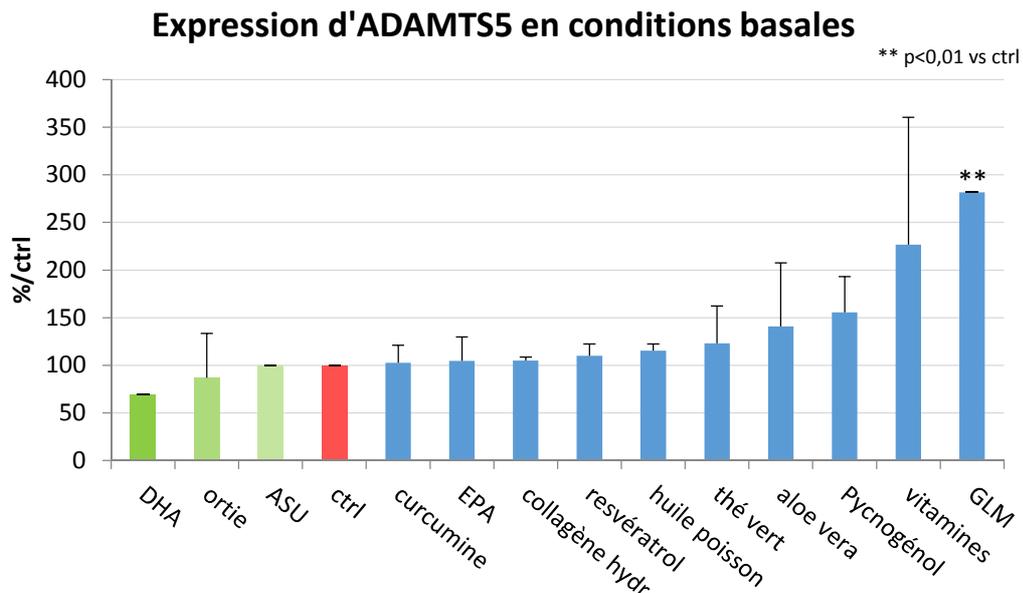


Figure 43. Expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogéno, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β tendait à stimuler l'expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes ($7,3 \pm 3,9$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $2,5 \pm 1$ copies/HPRT en absence d'IL-1 β , $p=0,361$). Lors d'une stimulation à l'IL-1 β , l'extrait de curcuminoïdes à $3,68 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,046$), le DHA à $3,28 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,05$), l'huile de poisson à $77,5 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,045$) et l'extrait d'ortie à $10 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,039$) diminuaient significativement l'expression des ADAMTS5. Par contre, lors d'une stimulation à l'IL-1 β , le pycnogéno à $25 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,004$) augmentait significativement l'expression des ADAMTS5 (Figure 44).

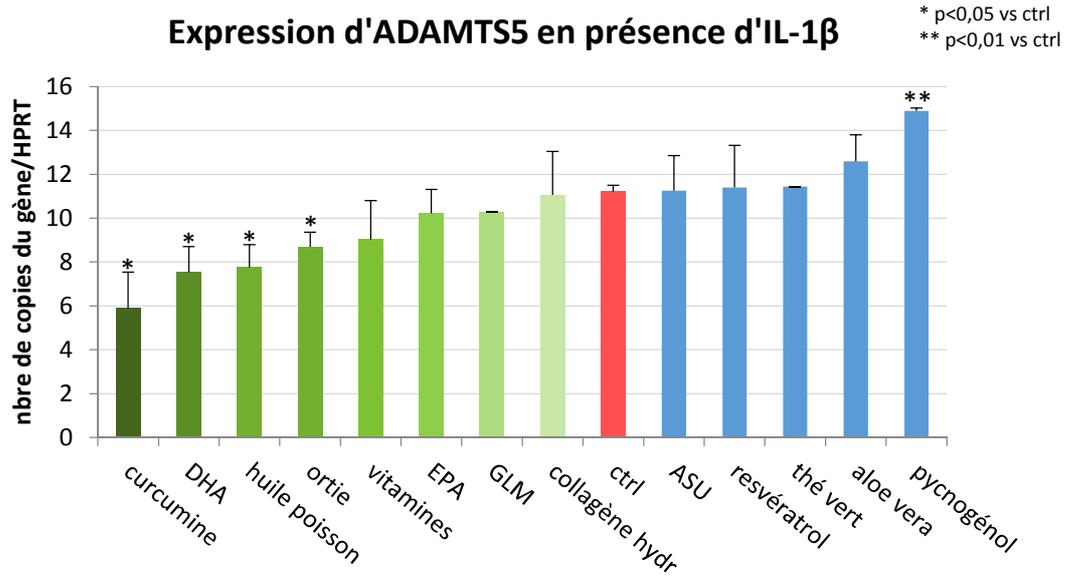


Figure 44. Expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloe vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.3 Les paramètres anaboliques

3.3.1.3.1 Expression du gène codant pour l'agrécane

En l'absence d'IL-1 β , l'aloe vera à 100 μ g/ml ($p=0,031$) et la GLM à 180 μ g/ml ($p=0,025$) diminuaient significativement l'expression de l'AGG ($p=0,031$) (Figure 45).

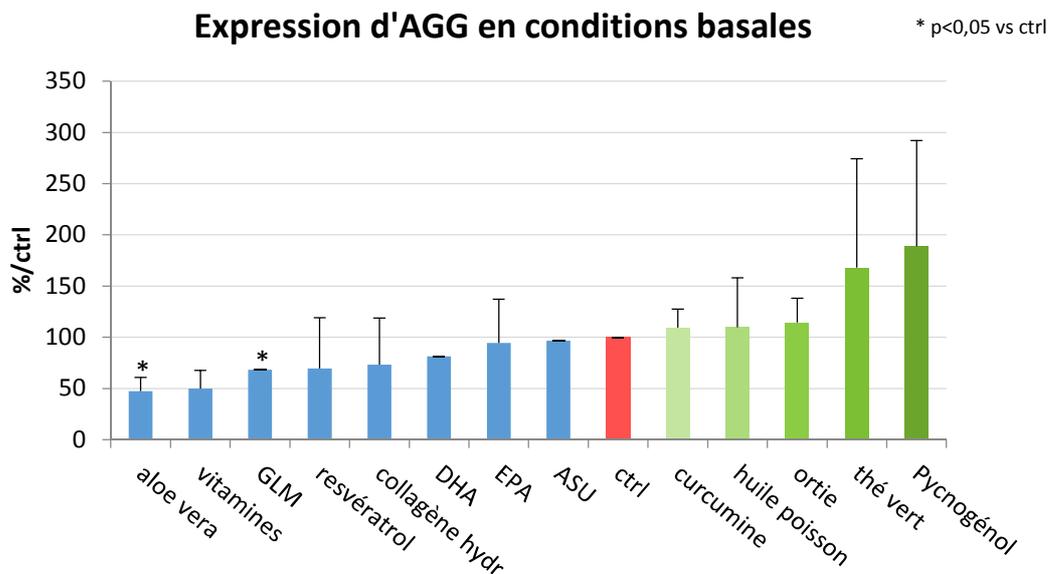


Figure 45. Expression d'AGG par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloe vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β tendait à inhiber l'expression de l'AGG par les chondrocytes ($30,5 \pm 9,6$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $160,8 \pm 62$ copies/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,2$). Lors d'une stimulation à l'IL-1 β , le pycnogénol à $25 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,005$) et l'huile de poisson à $77,5 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,032$) stimulaient significativement l'expression de l'AGG, et donc la régénération de la matrice (Figure 46).

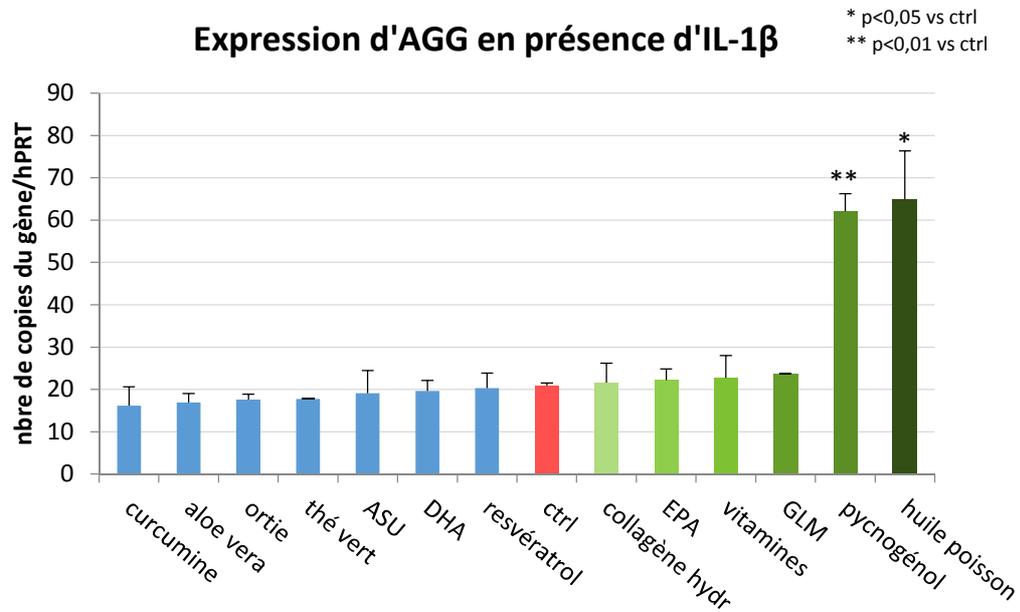


Figure 46. Expression d'AGG par les chondrocytes bovins traités à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloé vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogénol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.3.2 Expression du gène codant pour le collagène de type II

En l'absence d'IL-1 β , la GLM à $180 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$), le mélange de vitamines à $184,58 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$), le DHA ($p=0,037$), l'aloé vera à $100 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,02$) et l'extrait de curcuminoïdes à $3,68 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,009$) diminuaient significativement l'expression du collagène de type II (Figure 47).

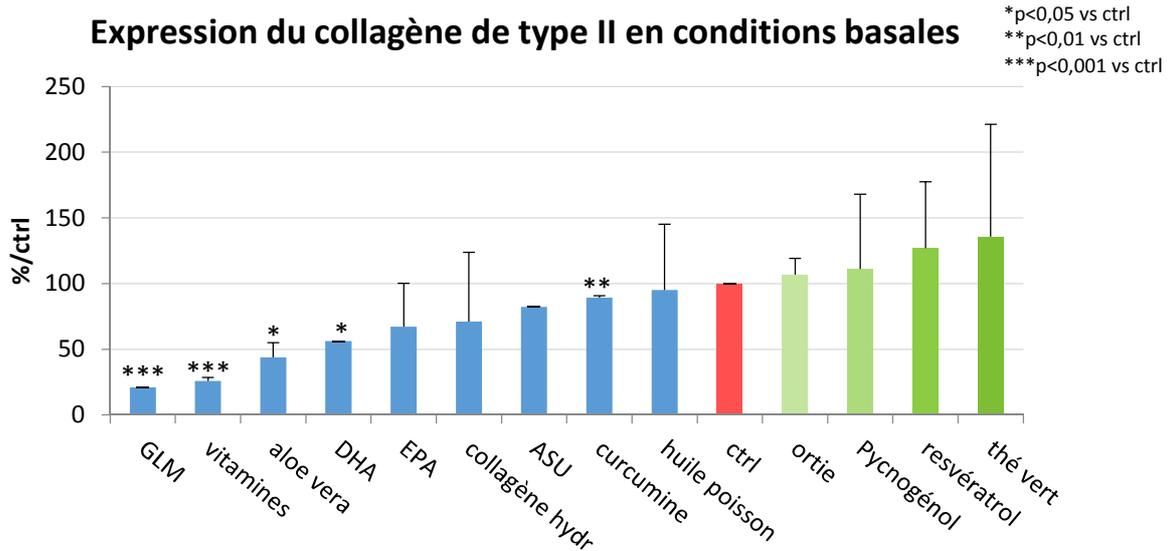


Figure 47. Expression de collagène de type II par les chondrocytes bovins en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogérol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

L'IL-1 β tendait à inhiber l'expression du collagène de type II par les chondrocytes ($69,7 \pm 9,8$ copies/HPRT en présence d'IL-1 β versus $604 \pm 192,3$ copies/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,121$). Lors d'une stimulation à l'IL-1 β , le pycnogérol à $25 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,004$) et l'huile de poisson à $77,5 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,015$) accentuaient de manière significative l'expression du collagène de type II (Figure 48).

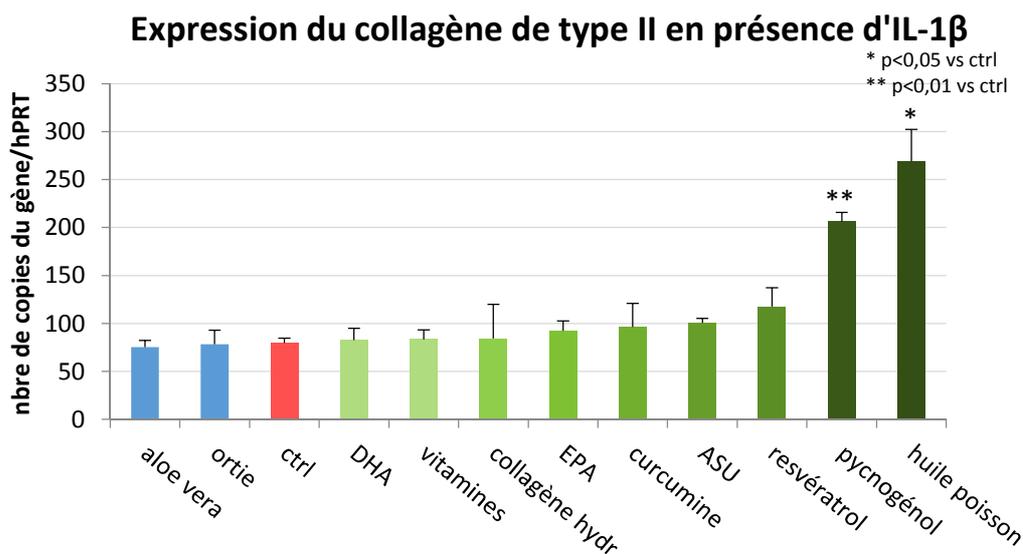


Figure 48. Expression du collagène de type II par les chondrocytes bovins traités à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'aloë vera, ASU, collagène hydrolysé, extrait de curcuminoïdes, DHA, EPA, GLM, huile de poisson, extrait d'ortie, pycnogérol, resvératrol, extrait de thé vert et mélange de vitamines.

3.3.1.4 Résumé

Sur base de ces résultats, cinq actifs ont été exclus, car ils présentaient des effets défavorables sur le métabolisme des chondrocytes comme une augmentation des MMP ou une diminution de la synthèse des composés matriciels. Il s'agit de l'aloë vera, des ASU, de l'EPA, de la GLM et du mélange de vitamines (Tableaux 7 et 8).

Tableau 7. Résumé des effets des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes bovins en conditions basales.

	Production		Expression							
	Inflammation				Catabolisme			Anabolisme		
	NO ₂	PGE ₂	IL-6	COX2	iNOS	MMP-3	ADAMTS4	ADAMTS5	AGG	Collagène de type II
Aloë vera	↑	↑							↓	↓
ASU										
Collagène hydrolysé				↓		↓				
Extrait de curcuminoïdes										↓
DHA										
EPA		↑								
GLM	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
Huile de poisson					↑					
Extrait d'ortie				↓						
Pycnogénol	↑									
Resvératrol										
Extrait de thé vert					↑					
Mélange de vitamines	↑	↑								↓

Les flèches orientées vers le haut représentent une augmentation significative. Les flèches orientées vers le bas représentent une diminution significative. La couleur verte signifie que l'effet est favorable et la couleur rouge que l'effet est défavorable. ASU=insaponifiables d'avocat et de soja, DHA=acide docosahexaénoïque, EPA=acide eicosapentaénoïque, GLM=*green lipped mussel*, NO₂=nitrite, PGE₂=prostaglandine E₂, IL-6=interleukine-6, COX2=cyclooxygénase 2, iNOS=synthase d'oxyde nitrique inducible, MMP-3=métalloprotéase matricielle-3, ADAMTS4=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 4*, ADAMTS5=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 5*, AGG=agrécane.

Tableau 8. Résumé des effets des actifs nutritionnels sur le métabolisme des chondrocytes bovins en présence d'IL-1 β .

	Production					Expression				
	Inflammation					Catabolisme			Anabolisme	
	NO ₂	PGE ₂	IL-6	COX2	iNOS	MMP-3	ADAMTS4	ADAMTS5	AGG	Collagène de type II
Aloe vera	↑			↓			↑			
ASU	↑*						↑			
Collagène hydrolysé	↑									
Extrait de curcuminoïdes	↓		↓	↓				↓		
DHA	↑	↓		↓				↓		
EPA	↑									
GLM	↓*	↑*								
Huile de poisson				↓		↓		↓	↑	↑
Extrait d'ortie	↑							↓		
Pycnogénol		↓	↓	↓	↑		↑	↑	↑	↑
Resvératrol										
Extrait de thé vert		↓								
Mélange de vitamines	↑	↑*								↓

Les flèches orientées vers le haut représentent une augmentation significative. Les flèches orientées vers le bas représentent une diminution significative. La couleur verte signifie que l'effet est favorable et la couleur rouge que l'effet est défavorable. Les astérisques indiquent un effet observé lorsque les actifs nutritionnels étaient ajoutés en pré-incubation 48 h avant la stimulation par l'IL-1 β . ASU=insaponifiables d'avocat et de soja, DHA=acide docosahexaénoïque, EPA=acide eicosapentaénoïque, GLM=*green lipped mussel*, NO₂=nitrite, PGE₂=prostaglandine E₂, IL-6=interleukine-6, COX2=cyclooxygénase 2, iNOS=synthase d'oxyde nitrique inductible, MMP-3=métalloprotéase matricielle-3, ADAMTS4=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 4*, ADAMTS5=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 5*, AGG=agrécane.

Malgré leurs effets bénéfiques, l'huile de poisson, le DHA et le pycnogénol ont été évincés, car leur utilisation comme complément alimentaire n'était pas libre d'exploitation. Par ailleurs, le DHA et le pycnogénol montraient des effets variables. Le resvératrol est principalement trouvé dans les raisins. Or, les raisins sont toxiques pour les chiens et par conséquent la présence de resvératrol dans les aliments canins n'est pas autorisée par le Registre Communautaire des Additifs Alimentaires conformément au Règlement (CE) numéro 1831/2003 [261]. Les effets de l'extrait d'ortie sont méconnus. De plus, cet actif n'a jamais été administré à des chiens. Sa sûreté n'a donc jamais été démontrée. Par conséquent, l'extrait d'ortie a été éliminé de la suite de notre étude. Les trois actifs sélectionnés étaient l'extrait de curcuminoïdes (C), le collagène hydrolysé (O) et l'extrait de thé vert (T) (Figure 49).

Aloe vera ASU EPA GLM Mélange de vitamines		Effets défavorables sur le métabolisme des chondrocytes
Huile de poisson DHA Pycnogénol		Non libres d'exploitation
Resvératrol		Non autorisé par le Registre Communautaire des Additifs Alimentaires
Ortie		Peu étudiée, tolérance jamais démontrée
Extrait de curcuminoïdes Collagène hydrolysé Extrait de thé vert		Absence de signe de toxicité Effets favorables sur le métabolisme des chondrocytes Apport en acides aminés par le collagène hydrolysé Pas de barrière légale ni commerciale

Figure 49. Justification de la sélection des trois actifs nutritionnels.

3.3.2 Étude des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert sur le métabolisme des chondrocytes bovins

C, O et T ont été testés à quatre concentrations différentes (0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 12,5 µg/ml et 62,5 µg/ml), en présence d'IL-1 β ou non, sur des chondrocytes primaires bovins. L'objectif était de déterminer la concentration optimale de ces actifs nutritionnels sur la synthèse de marqueurs de l'inflammation, du catabolisme et de l'anabolisme. Trois cultures indépendantes de chondrocytes bovins ont été réalisées. Les résultats ont été exprimés en % par rapport au ctrl (100 %). Les moyennes et les p-valeurs sont donc calculées sur ces %.

3.3.2.1 Les paramètres inflammatoires

3.3.2.1.1 Production de nitrite

En l'absence d'IL-1 β , la production de NO₂ par les chondrocytes était extrêmement faible, voire indétectable. Aucun actif nutritionnel ne modifiait significativement la production de NO₂.

L'IL-1 β stimulait la production de NO₂ par les chondrocytes (5,16 \pm 1,42 nmole/ μ g d'ADN en présence d'IL-1 β), alors que la production de NO₂ en l'absence d'IL1 β était sous la limite de détection du test. C aux concentrations de 12,5 et 62,5 μ g/ml inhibait complètement l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de NO₂ ($p=0,01$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre (Figure 50).

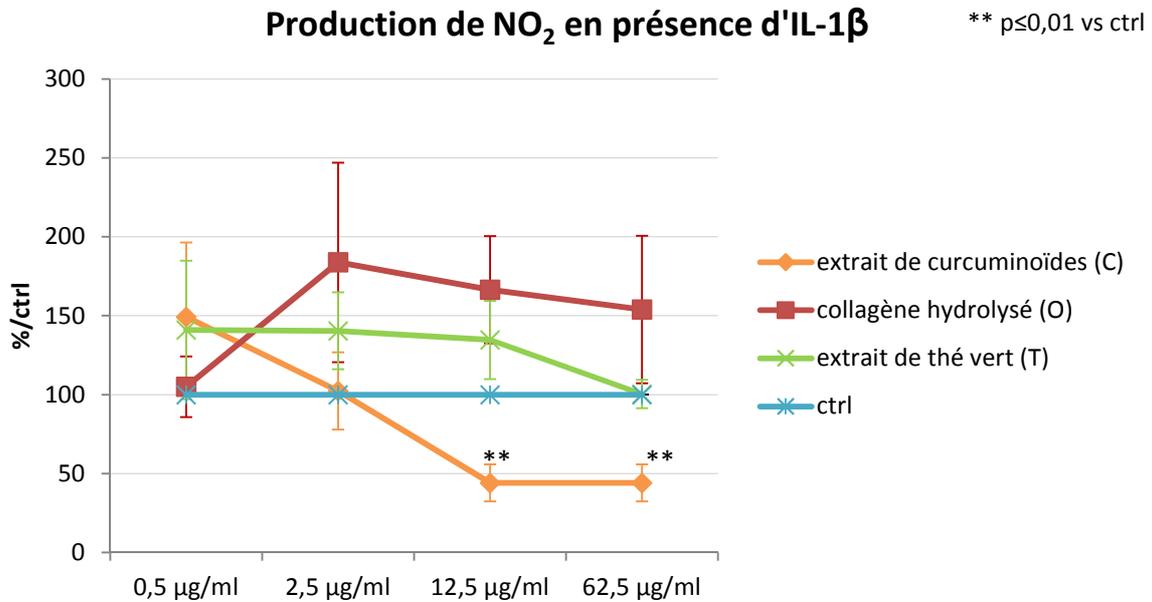


Figure 50. Production de NO₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 12,5 μ g/ml et 62,5 μ g/ml.

3.3.2.1.2 Production de prostaglandine E₂

En l'absence d'IL-1 β , la production de PGE₂ par les chondrocytes était sous le seuil de détection du test, avec tous les actifs nutritionnels à toutes les concentrations.

L'IL-1 β stimulait la production de PGE₂ par les chondrocytes (8372,95 \pm 5187,35 pg/ μ g d'ADN en présence d'IL-1 β versus indétectable en absence d'IL1 β). C aux concentrations de 2,5, 12,5 et 62,5 μ g/ml inhibait l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de PGE₂ (IL-1 β : 8372,95 \pm 5187,35 pg/ μ g ADN; 2,5 μ g/ml: 1753,93 \pm 878,64 pg/ μ g ADN, $p=0,048$; 12,5 μ g/ml: 9,19 \pm 9,19 pg/ μ g ADN, $p=0,008$ et 62,5 μ g/ml: 9,31 \pm 9,31 pg/ μ g ADN, $p=0,008$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre (Figure 51).

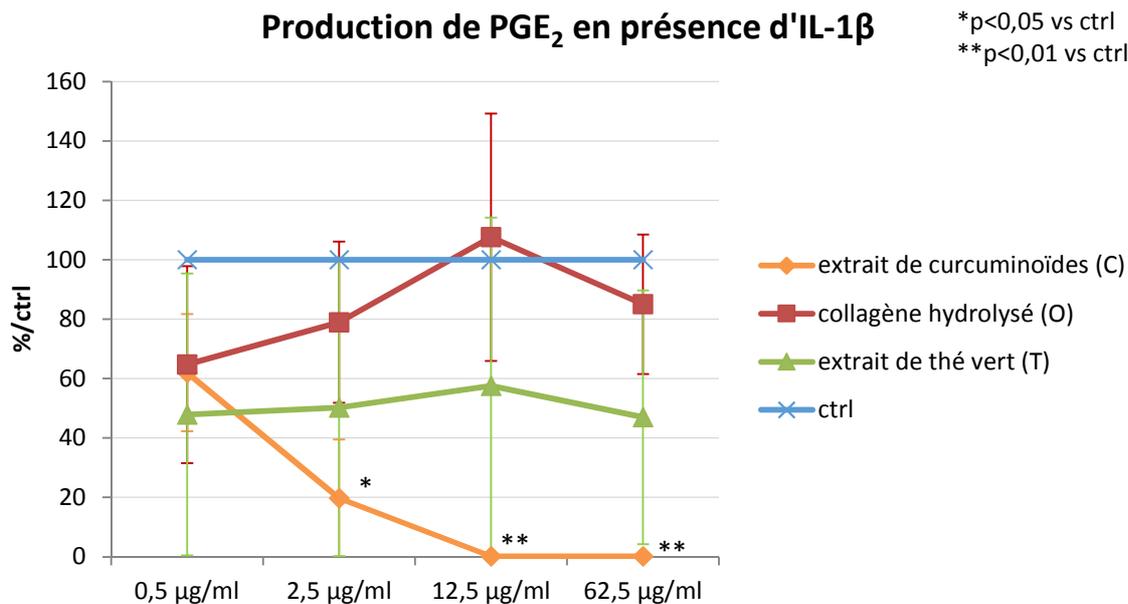


Figure 51. Production de PGE₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μg/ml, 2,5 μg/ml, 12,5 μg/ml et 62,5 μg/ml.

3.3.2.1.3 Expression du gène codant pour l'interleukine-6

En l'absence d'IL-1 β , T à la concentration de 62,5 μg/ml induisait l'expression d'IL-6 (p=0,034). C et O n'avaient pas d'effet sur l'expression d'IL-6 en conditions basales.

L'IL-1 β stimulait de façon significative l'expression d'IL-6 par les chondrocytes (100,23 ± 18,99 copies IL-6/HPRT en présence d'IL-1 β versus 0,43 ± 0,23 copies IL-6/HPRT en absence d'IL-1 β , p=0,006). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C aux concentrations de 12,5 et 62,5 μg/ml diminuait significativement l'expression d'IL-6 (IL-1 β : 100,23 ± 18,99 copies IL-6/HPRT; 12,5 μg/ml: 3,67 ± 2,52 copies IL-6/HPRT, p<0,001; 62,5 μg/ml: 2,37 ± 1,28 copies IL-6/HPRT, p<0,001). T à la concentration la plus élevée (62,5 μg/ml) diminuait significativement l'expression d'IL-6 (IL-1 β : 100,23 ± 18,99 copies IL-6/HPRT; 62,5 μg/ml: 35,6 ± 4,92 copies IL-6/HPRT, p=0,031). Par contre, O n'avait pas d'effet sur ce paramètre (Figure 52).

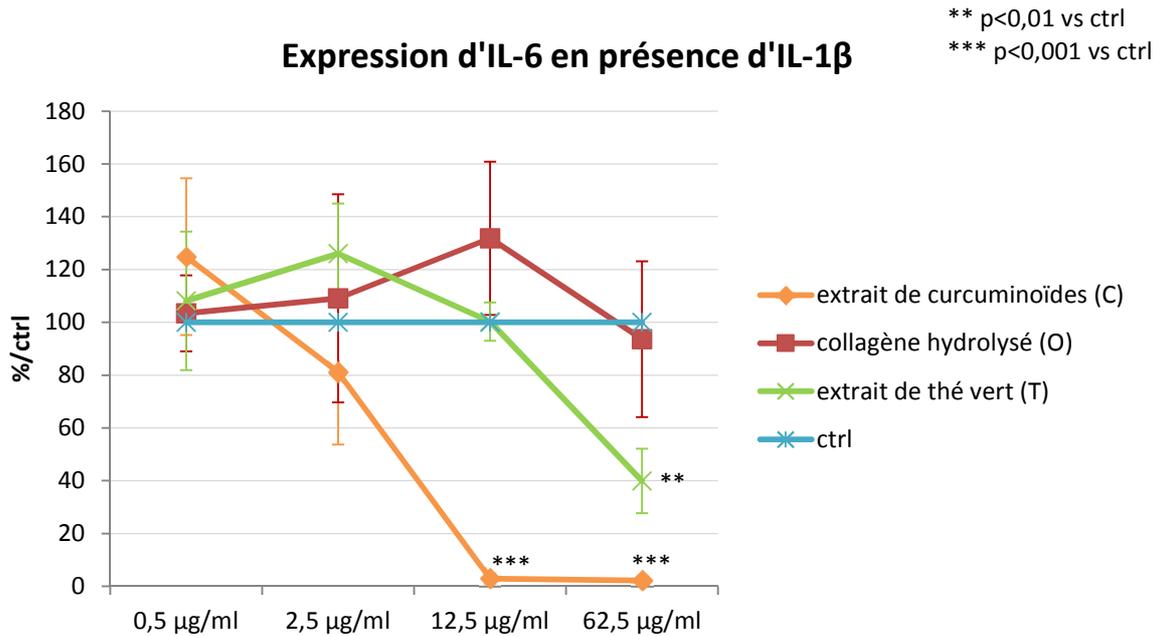


Figure 52. Expression d'IL-6 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 12,5 µg/ml et 62,5 µg/ml.

3.3.2.1.4 Expression du gène codant pour la cyclooxygénase 2

En l'absence d'IL-1 β , T à la concentration de 62,5 µg/ml augmentait significativement l'expression de COX2 ($p=0,006$). C et O n'avaient pas d'effet sur l'expression de COX2 en conditions basales.

L'IL-1 β stimulait l'expression de COX2 par les chondrocytes ($13,93 \pm 4,52$ copies COX2/HPRT en présence d'IL-1 β versus $1,62 \pm 0,93$ copies COX2/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,05$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C aux concentrations de 12,5 et 62,5 µg/ml, diminuait significativement l'expression de COX2 (IL-1 β : $13,93 \pm 4,52$ copies COX2/HPRT; 12,5 µg/ml: $4,79 \pm 2,77$ copies COX2/HPRT, $p<0,001$; 62,5 µg/ml: $5,01 \pm 2,9$ copies COX2/HPRT, $p<0,001$). T à la concentration de 62,5 µg/ml diminuait significativement l'expression de COX2 (IL-1 β : $13,93 \pm 4,52$ copies COX2/HPRT; 62,5 µg/ml: $9 \pm 4,69$ copies COX2/HPRT, $p=0,031$). Enfin, O n'avait pas d'effet sur ce paramètre (Figure 53).

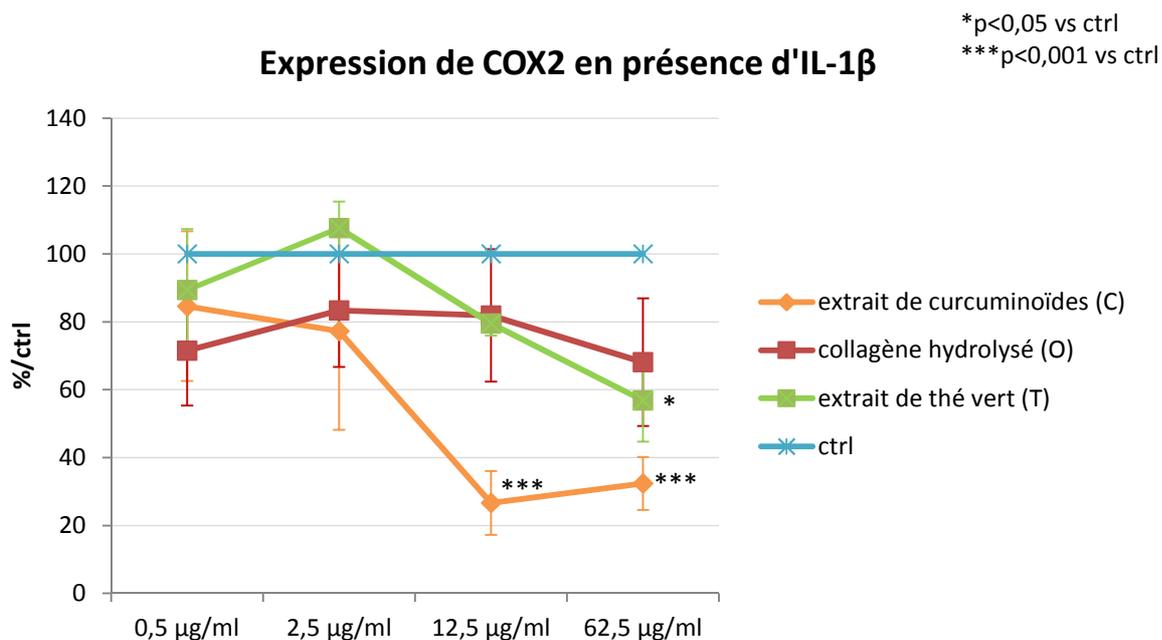


Figure 53. Expression de COX2 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 12,5 μ g/ml et 62,5 μ g/ml.

3.3.2.1.5 Expression du gène codant pour la synthèse d'oxyde nitrique inducible

En l'absence d'IL-1 β , T à la concentration de 62,5 μ g/ml augmentait plus de dix fois l'expression d'iNOS ($p=0,001$). C et O n'avaient pas d'effet sur l'expression d'iNOS en conditions basales.

L'IL-1 β stimulait de façon significative l'expression d'iNOS par les chondrocytes ($99,43 \pm 1,59$ copies iNOS/HPRT en présence d'IL-1 β versus $7,83 \pm 2,83$ copies iNOS/HPRT en absence d'IL1 β , $p<0,001$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C aux concentrations de 12,5 et 62,5 μ g/ml diminuait significativement l'expression d'iNOS (IL-1 β : $99,43 \pm 1,59$ copies iNOS/HPRT; 12,5 μ g/ml: $5,33 \pm 3,26$ copies iNOS/HPRT, $p<0,001$; 62,5 μ g/ml: $5,33 \pm 1,41$ copies iNOS/HPRT $p<0,001$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre (Figure 54).

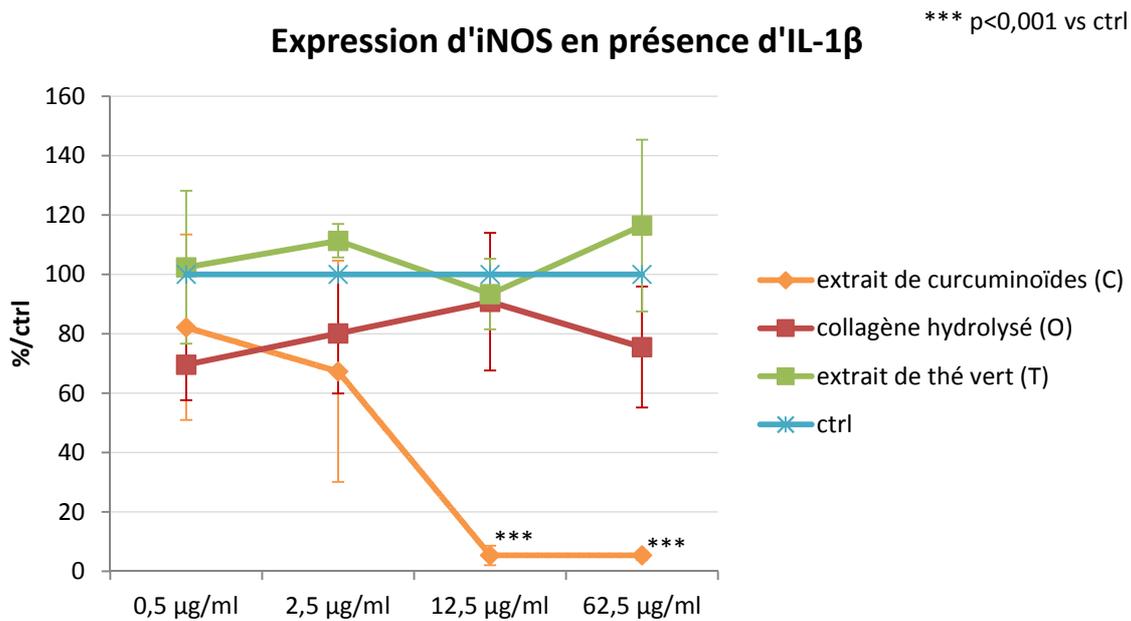


Figure 54. Expression d'iNOS par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 12,5 μ g/ml et 62,5 μ g/ml.

3.3.2.2 Les paramètres cataboliques

3.3.2.2.1 Expression du gène codant pour la métalloprotéase matricielle-3

En l'absence d'IL-1 β , T à la concentration de 62,5 μ g/ml induisait une forte expression de MMP-3 à la concentration de 62,5 μ g/ml ($p < 0,001$). C et O n'avaient pas d'effet sur l'expression de MMP-3 en conditions basales.

L'IL-1 β stimulait de manière significative l'expression de MMP-3 ($220,05 \pm 47,15$ copies MMP-3/HPRT en présence d'IL-1 β versus 3 ± 1 copies MMP-3/HPRT en absence d'IL-1 β , $p = 0,044$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C aux concentrations de 12,5 et 62,5 μ g/ml diminuait significativement l'expression de MMP-3 (IL-1 β : $220,05 \pm 38,5$ copies MMP-3/HPRT; 12,5 μ g/ml: $18,25 \pm 8,86$ copies MMP-3/HPRT, $p < 0,001$; 62,5 μ g/ml: $9,1 \pm 2,2$ copies MMP-3/HPRT, $p < 0,001$). O à la concentration de 12,5 μ g/ml augmentait significativement l'expression de MMP-3 (IL-1 β : $220,05 \pm 38,5$ copies MMP-3/HPRT; 12,5 μ g/ml: $337,35 \pm 67,81$ copies MMP-3/HPRT, $p = 0,006$). T n'avait pas d'effet sur ce paramètre (Figure 55).

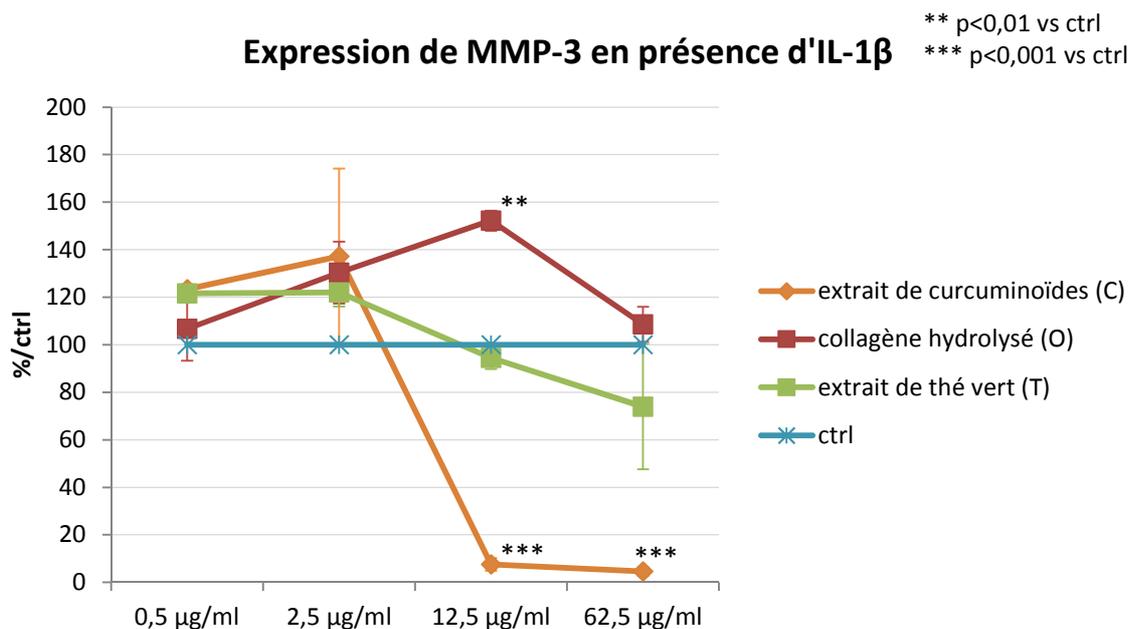


Figure 55. Expression de MMP-3 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.2.2 Expression du gène codant pour l'aggrécanase 4

En l'absence d'IL-1 β , les actifs nutritionnels n'avaient pas d'effet sur l'expression d'ADAMTS4.

L'IL-1 β stimulait de façon significative l'expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes ($7,53 \pm 2,24$ copies ADAMTS4/HPRT en présence d'IL-1 β versus $0,6 \pm 0,4$ copies ADAMTS4/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,04$). C aux concentrations de 12,5 et 62,5 $\mu\text{g/ml}$ diminuait significativement l'expression d'ADAMTS4 (IL-1 β : $7,3 \pm 2,24$ copies ADAMTS4/HPRT; 12,5 $\mu\text{g/ml}$: $1,47 \pm 0,75$ copies ADAMTS4/HPRT, $p<0,001$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$: $1,5 \pm 0,85$ copies ADAMTS4/HPRT, $p<0,001$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre (Figure 56).

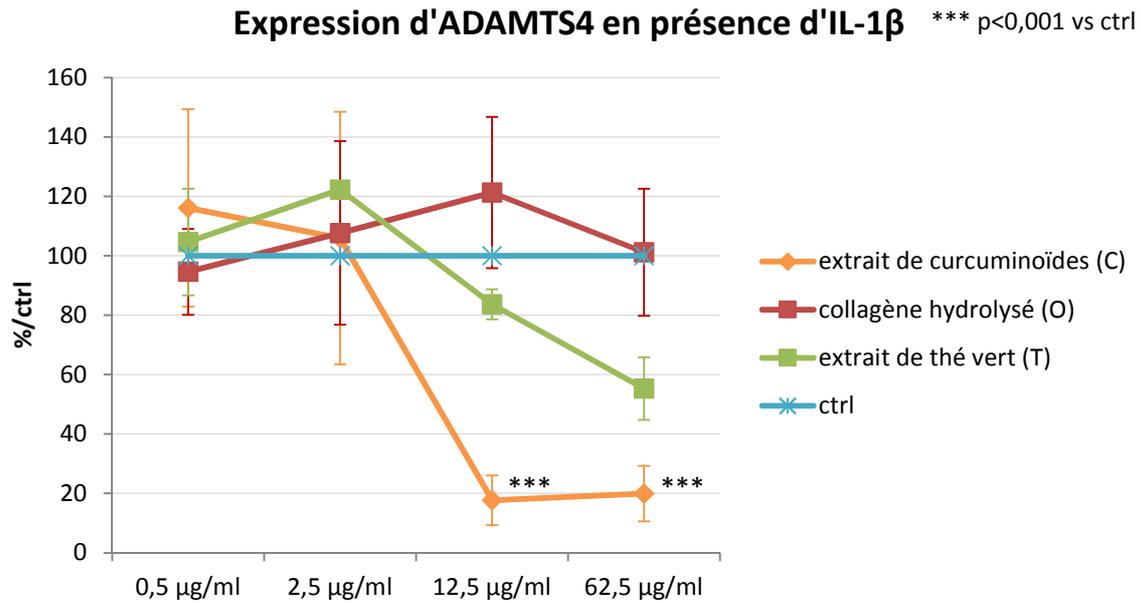


Figure 56. Expression d'ADAMTS4 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et 62,5 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.2.2.3 Expression du gène codant pour l'aggrécanase 5

En l'absence d'IL-1 β , les actifs nutritionnels n'avaient pas d'effet sur l'expression d'ADAMTS5.

L'IL-1 β stimulait de façon significative l'expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes ($37,67 \pm 4,39$ copies ADAMTS5/HPRT en présence d'IL-1 β versus $13,13 \pm 2,64$ copies ADAMTS5/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,009$). C aux concentrations de 12,5 et 62,5 $\mu\text{g/ml}$ diminuait significativement l'expression d'ADAMTS5 (IL-1 β : $37,67 \pm 4,39$ copies ADAMTS5/HPRT; 12,5 $\mu\text{g/ml}$: $11,87 \pm 3,42$ copies ADAMTS5/HPRT, $p=0,007$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$: $9,77 \pm 3,01$ copies ADAMTS5/HPRT, $p=0,004$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre (Figure 57).

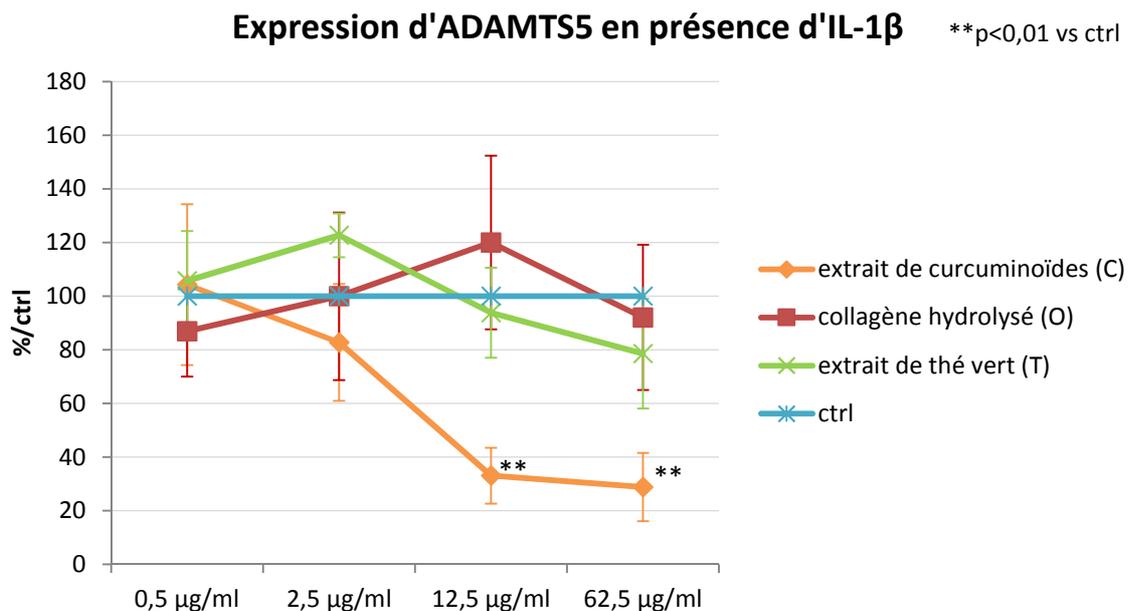


Figure 57. Expression d'ADAMTS5 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, aux concentrations de 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 12,5 μ g/ml et 62,5 μ g/ml.

3.3.2.3 Les paramètres anaboliques

3.3.2.3.1 Expression du gène codant pour l'agrécane

En l'absence d'IL-1 β , les actifs nutritionnels n'avaient pas d'effet sur l'expression d'AGG.

L'IL-1 β avait tendance à inhiber l'expression des AGG par les chondrocytes ($22,8 \pm 5,46$ copies AGG/HPRT en présence d'IL-1 β versus $146,9 \pm 82,51$ copies AGG/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,208$). Les actifs nutritionnels ne permettaient pas d'augmenter significativement l'expression des AGG.

3.3.2.3.2 Expression du gène codant pour le collagène de type II

En l'absence d'IL-1 β , T à la concentration de 12,5 μ g/ml diminuait significativement l'expression du collagène de type II ($p=0,048$). C et O n'avaient pas d'effet sur l'expression du collagène de type II.

L'IL-1 β inhibait l'expression du collagène de type II par les chondrocytes ($143,7 \pm 46,5$ copies collagène type II/HPRT en présence d'IL-1 β versus $714,1 \pm 254,3$ copies collagène type II/HPRT en absence d'IL1 β , $p=0,092$). Les actifs nutritionnels n'avaient pas d'effet sur l'expression du collagène de type II.

3.3.2.4 Résumé

Cette étude a confirmé les effets anti-IL-1 β de C sur la production des médiateurs de l'inflammation et du catabolisme. Les effets étaient statistiquement significatifs aux concentrations de 12,5 et 62,5 mg/ml (Tableau 9). La concentration de 12,5 μ g/ml était la concentration optimale, car elle induisait un effet maximal sur ces paramètres sans induire de toxicité. Par ailleurs, T à la concentration de 62,5 μ g/ml inhibait l'expression d'IL-6 et COX2 par les chondrocytes stimulés à l'IL-1 β (Tableau 9). Cependant, T à la concentration de 62,5 μ g/ml montrait des effets défavorables sur l'expression d'IL-6, COX2, MMP-3 et ADAMTS4 en conditions basales.

Tableau 9. Résumé des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert sur le métabolisme des chondrocytes bovins en présence d'IL-1 β .

	Production		Expression							
	NO ₂	PGE ₂	Inflammation			Catabolisme			Anabolisme	
			IL-6	COX2	iNOS	MMP-3	ADAMTS4	ADAMTS5	AGG	Collagène de type II
C	0,5 μ g/ml									
	2,5 μ g/ml		↓							
	12,5 μ g/ml	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
	62,5 μ g/ml	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
O	0,5 μ g/ml									
	2,5 μ g/ml									
	12,5 μ g/ml					↑				
	62,5 μ g/ml									
T	0,5 μ g/ml									
	2,5 μ g/ml									
	12,5 μ g/ml									
	62,5 μ g/ml			↓	↓					

La flèche orientée vers le haut représente une augmentation significative. Les flèches orientées vers le bas représentent une diminution significative. La couleur verte signifie que l'effet est favorable et la couleur rouge que l'effet est défavorable. C=extrait de curcuminoïdes, O=collagène hydrolysé, T=extrait de thé vert, NO₂=nitrite, PGE₂=prostaglandine E₂, IL-6=interleukine-6, COX2=cyclooxygénase 2, iNOS=synthase d'oxyde nitrique inductible, MMP-3=metallopeptase matricielle-3, ADAMTS4=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 4*, ADAMTS5=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 5*, AGG=agrécane.

3.3.3 Étude de mélanges sur le métabolisme des chondrocytes bovins

Dans cette partie de notre travail, C, O et T ont été mélangés et ensuite testés sur des chondrocytes bovins en monocouche, en présence d'IL-1 β ou non. L'objectif de ces expérimentations était de rechercher les effets additifs et/ou synergiques des trois actifs nutritionnels sur des chondrocytes primaires bovins, lorsqu'ils étaient ajoutés en combinaison. Trois cultures indépendantes de chondrocytes bovins ont été réalisées. Les résultats sont exprimés en % par rapport au ctrl (100 %). Les moyennes et les p-valeurs sont donc calculées sur ces %.

Nous avons observé que les effets bénéfiques des trois actifs existaient principalement en présence d'IL-1 β . Pour cette raison, nous ne présentons dans cette partie que les effets des actifs sur les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β .

3.3.3.1 Les paramètres inflammatoires

Les combinaisons CO et CT tendaient à être plus efficaces que C seul, sur tous les paramètres de l'inflammation. Cependant, les différences entre les groupes C, CO et CT n'étaient pas statistiquement significatives (Tableau 10).

Tableau 10. Effets des actifs nutritionnels, combinés par deux, sur la production et l'expression de médiateurs inflammatoires par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β . Les résultats sont exprimés en % du ctrl \pm SEM.

		C	CO	CT	
Production	NO ₂		3,84 \pm 3,84	0,0001 \pm 0,0001	0,0001 \pm 0,0001
		p-valeur vs ctrl	<0,0001	<0,0001	<0,0001
		p-valeur vs C		0,9996	0,9996
	PGE ₂		0,93 \pm 0,65	0,5 \pm 0,42	0,0001 \pm 0,0001
		p-valeur vs ctrl	0,9925	0,9924	0,9922
		p-valeur vs C		>0,9999	>0,9999
Expression	IL-6		16,37 \pm 6,39	10,93 \pm 9,43	0,47 \pm 0,16
		p-valeur vs ctrl	<0,0001	<0,0001	<0,0001
		p-valeur vs C		0,9988	0,7944
	COX2		48,72 \pm 16,15	42,36 \pm 25,5	13,28 \pm 7,83
		p-valeur vs ctrl	0,0719	0,0385	0,0021
		p-valeur vs C		0,9998	0,524
	iNOS		14,18 \pm 3,27	8,67 \pm 6,16	3,76 \pm 0,96
		p-valeur vs ctrl	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	p-valeur vs C		0,9879	0,8005	

Ctrl=chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , C=extrait de curcuminoïdes, CO=extrait de curcuminoïdes + collagène hydrolysé, CT=extrait de curcuminoïdes + extrait de thé vert, NO₂=nitrite, PGE₂=prostaglandine E₂, IL-6=interleukine-6, COX2=cyclooxygénase 2, iNOS=synthase d'oxyde nitrique inductible

Le mélange COT inhibait significativement les productions de NO₂ et de PGE₂ par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β (p<0,001). Cependant, l'effet inhibiteur du mélange COT n'était pas plus important que celui de C seul (Figure 58).

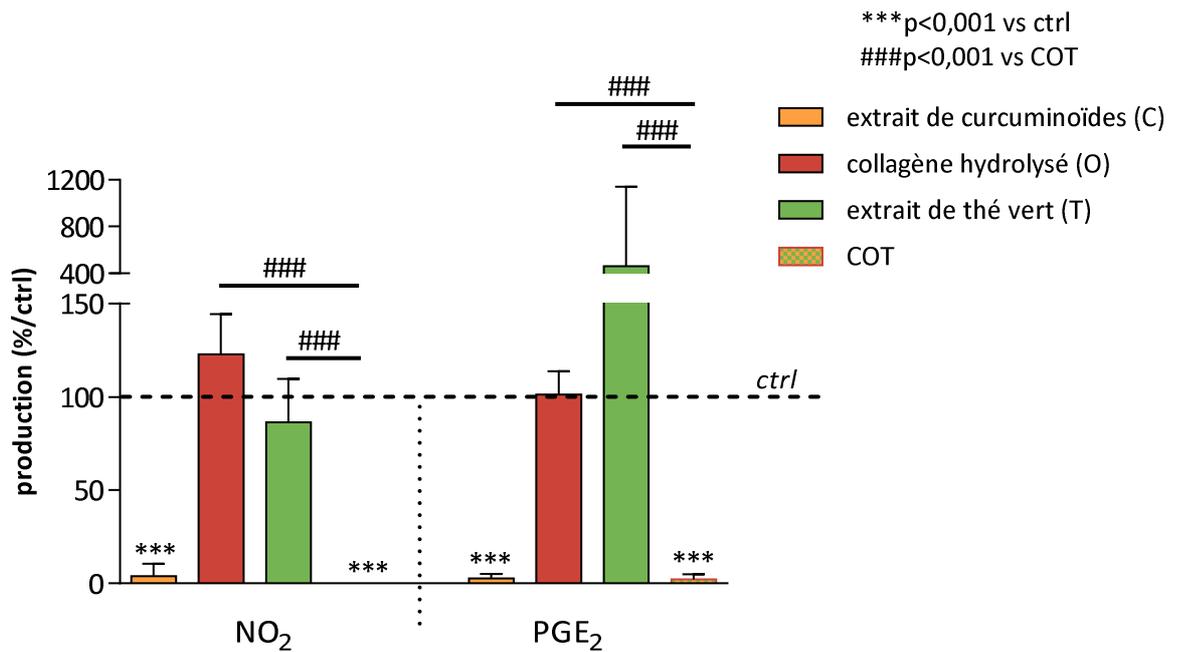


Figure 58. Production de NO₂ et de PGE₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 μ g/ml.

Le mélange COT inhibait significativement, et avec une plus grande amplitude que C seul, l'expression des gènes IL-6 (C : 52,73 \pm 15,64 copies IL-6/HPRT, $p < 0,001$; COT : 5,07 \pm 4,32 copies IL-6/HPRT, $p < 0,001$) et iNOS (C : 11,27 \pm 5,04 copies iNOS/HPRT, $p < 0,001$; COT : 3,5 \pm 2,41 copies iNOS/HPRT, $p < 0,001$) par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β . Par ailleurs, le mélange COT inhibait significativement l'expression de COX2 (1,07 \pm 0,38 copies COX2/HPRT, $p = 0,003$) et cet effet était significativement supérieur ($p = 0,037$) à celui de C (6,2 \pm 2,04 copies COX2/HPRT, $p = 0,042$) (Figure 59).

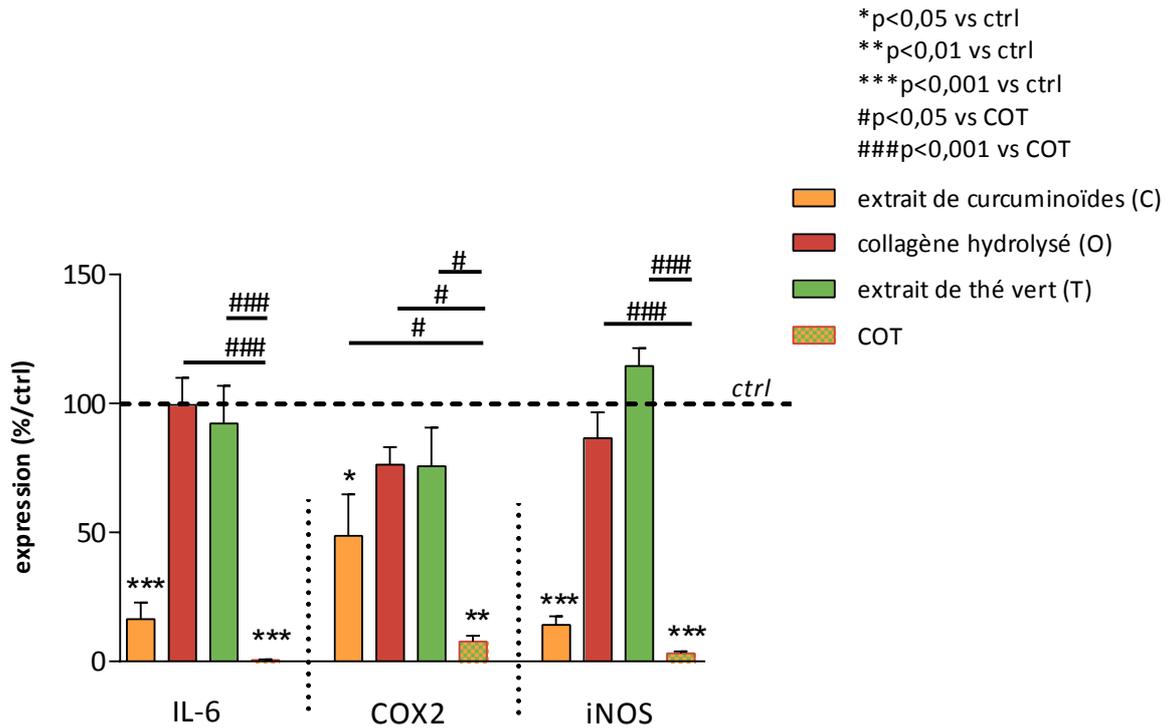


Figure 59. Expression d'IL-6, COX2 et iNOS par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 μ g/ml.

3.3.3.2 Les paramètres cataboliques

Les combinaisons CO et CT tendaient à être plus efficaces que C seul, sur tous les paramètres du catabolisme, lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β . Les différences entre les groupes C et CO n'étaient pas statistiquement significatives. Cependant, CT réduisait l'expression d'MMP-3 stimulée par l'IL-1 β avec une plus grande amplitude que C seul ($p=0,039$) (Tableau 11).

Tableau 11. Effets des actifs nutritionnels, combinés par deux, sur l'expression de médiateurs cataboliques par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β . Les résultats sont exprimés en % du ctrl \pm SEM.

		C	CO	CT	
Expression	MMP-3		42,5 \pm 3,07	15,41 \pm 8,62	1,21 \pm 0,24
		p-valeur vs ctrl	0,0011	<0,0001	<0,0001
		p-valeur vs C		0,2934	0,0386
	ADAMTS4		45,28 \pm 7,31	31,81 \pm 19,92	17,16 \pm 11,1
		p-valeur vs ctrl	0,0279	0,0061	0,0012
		p-valeur vs C		0,9818	0,6516
	ADAMTS5		53,33 \pm 18,18	48,02 \pm 21,45	24,32 \pm 6
		p-valeur vs ctrl	0,1905	0,1261	0,0168
		p-valeur vs C		>0,9999	0,8233

Ctrl=chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , C=extrait de curcuminoïdes, CO=extrait de curcuminoïdes + collagène hydrolysé, CT=extrait de curcuminoïdes + extrait de thé vert, MMP-3=metallopeptase matricielle-3, ADAMTS4=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 4*, ADAMTS5=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 5*.

Le mélange COT et C seul inhibaient significativement l'expression du gène MMP-3 (C : 85,8 \pm 44,88 copies MMP-3/HPRT, $p=0,003$; COT : 1,87 \pm 0,93 copies MMP-3/HPRT, $p<0,001$). De plus, COT réduisait significativement l'expression d'MMP-3 stimulée par l'IL-1 β avec une plus grande amplitude que C seul ($p=0,038$). Le mélange COT et C seul inhibaient significativement l'expression du gène ADAMTS4 (C : 4,47 \pm 2,09 copies ADAMTS4/HPRT, $p=0,028$; COT : 1,23 \pm 0,48 copies ADAMTS4/HPRT, $p=0,001$). Par ailleurs, le mélange COT inhibait significativement l'expression d'ADAMTS5 (29,67 \pm 4,68 copies ADAMTS5/HPRT, $p=0,025$) par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β alors que les actifs nutritionnels seuls n'avaient pas d'effet sur ce paramètre (Figure 60).

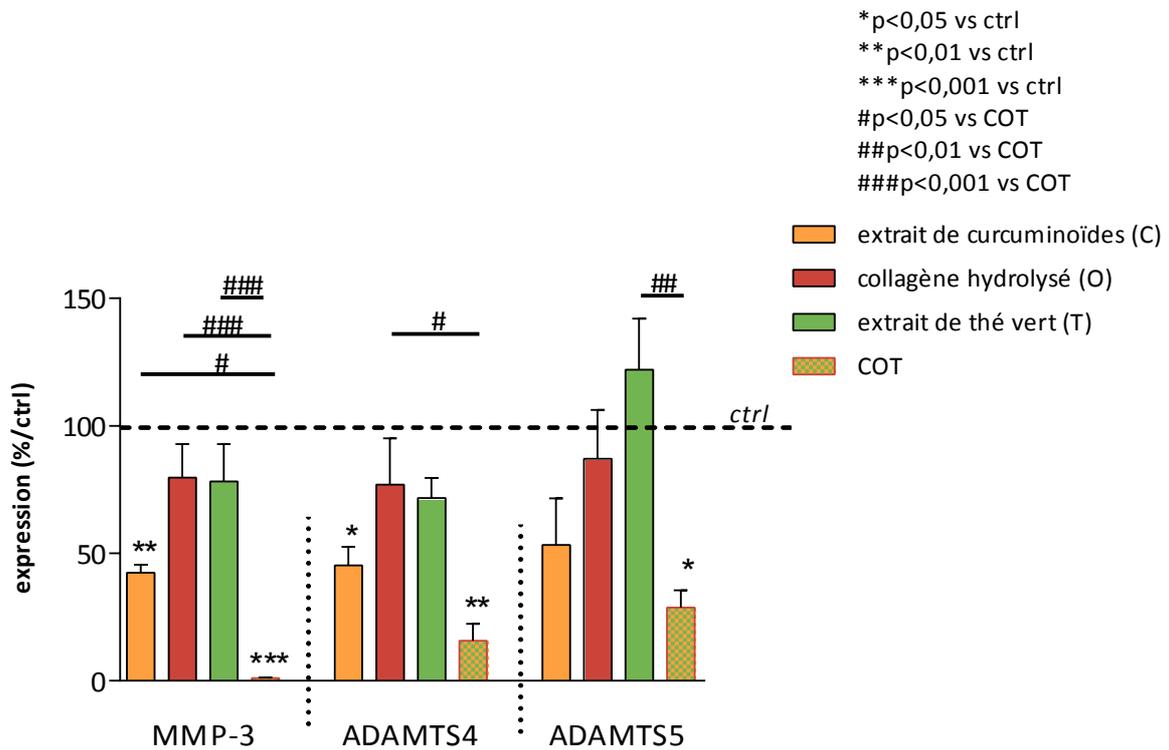


Figure 60. Expression de MMP-3, ADAMTS4 et ADAMTS5 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 μ g/ml.

3.3.3.3 Les paramètres anaboliques

La combinaison CT tendait à être plus efficace que C seul, sur les deux paramètres de l'anabolisme mesurés, lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β . C seul et la combinaison CO n'avaient pas d'effet bénéfique sur ces deux médiateurs de l'anabolisme. Les différences entre les groupes C, CO et CT n'étaient pas statistiquement significatives (Tableau 12).

Tableau 12. Effets des actifs nutritionnels, combinés par deux, sur l'expression de médiateurs anaboliques par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche traités à l'IL-1 β . Les résultats sont exprimés en % du ctrl \pm SEM.

			C	CO	CT
Expression	AGG		23,39 \pm 4,33	17,78 \pm 0,4	285,81 \pm 196,81
		p-valeur vs ctrl	0,9944	0,9923	0,7711
		p-valeur vs C		>0,9999	0,729
	Collagène de type II		42,85 \pm 18,3	32,74 \pm 14,8	129,34 \pm 85,2
		p-valeur vs ctrl	0,9156	0,8482	0,9957
		p-valeur vs C		>0,9999	0,8769

Ctrl=chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , C=extrait de curcuminoïdes, CO=extrait de curcuminoïdes + collagène hydrolysé, CT=extrait de curcuminoïdes + extrait de thé vert, AGG=agrécane.

Le mélange COT tendait à réduire l'effet inhibiteur de l'IL-1 β sur l'expression d'AGG ($p=0,261$). De plus, le mélange COT avait un effet significativement supérieur à celui de C ($p=0,027$). Le mélange COT n'avait pas d'effet significatif sur l'expression du collagène de type II ($p=0,854$) par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés à l'IL-1 β (Figure 61).

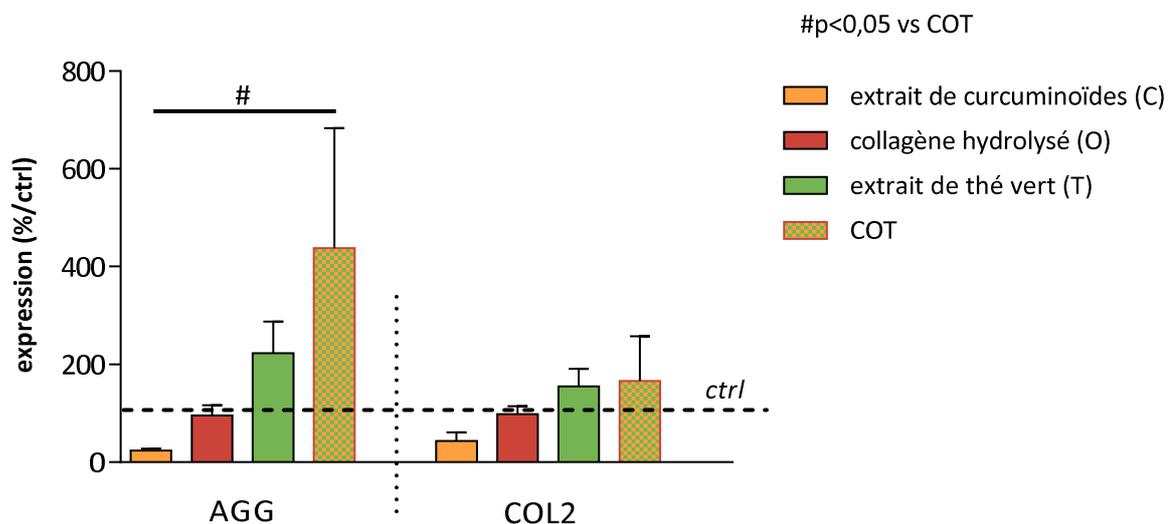


Figure 61. Expression d'AGG et du collagène de type II par les chondrocytes bovins traités à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 12,5 μ g/ml.

3.3.3.4 Résumé

C seul inhibait la synthèse de NO₂, PGE₂, IL-6, COX2, iNOS, MMP-3 et ADAMTS4. Le mélange COT, quant à lui, diminuait la synthèse de NO₂, PGE₂, IL-6, COX2, iNOS, MMP-3, ADAMTS4 et ADAMTS5 (Tableau 13). Le mélange était plus actif sur l'expression des gènes codant pour COX-2, MMP-3 et ADAMTS5 que les actifs seuls.

Tableau 13. Résumé des effets du mélange de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert sur le métabolisme des chondrocytes bovins en présence d'IL-1β.

	Production					Expression				
	Inflammation					Catabolisme			Anabolisme	
	NO ₂	PGE ₂	IL-6	COX2	iNOS	MMP-3	ADAMTS4	ADAMTS5	AGG	Collagène de type II
C	***	***	***	*	***	**	*			
O										
T										
COT	***	***	***	**	***	***	**	**	**	

Les étoiles vertes représentent un effet favorable significatif. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001. C=extrait de curcuminoïdes, O=collagène hydrolysé, T=extrait de thé vert, NO₂=nitrite, PGE₂=prostaglandine E₂, IL-6=interleukine-6, COX2=cyclooxygénase 2, iNOS=synthase d'oxyde nitrique inducible, MMP-3=metallopeptase matricielle-3, ADAMTS4=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 4*, ADAMTS5=*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 5*, AGG=agrécane.

Lors de nos différentes expérimentations sur des chondrocytes bovins cultivés en monocouche, nous avons observé les cellules au microscope. Les différents actifs nutritionnels, de même que la présence d'IL-1β ou non, ne modifiaient pas la morphologie des chondrocytes (Figure 62).

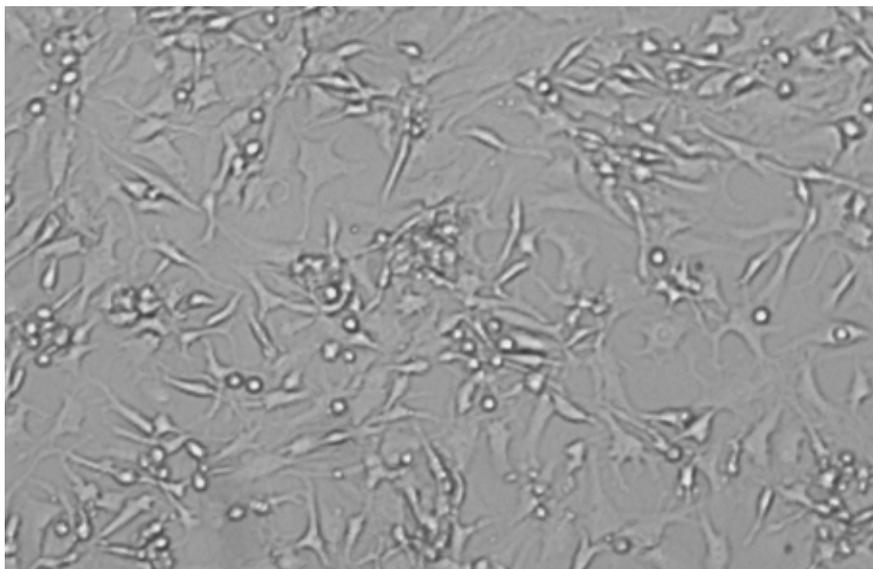


Figure 62. Photographie de chondrocytes bovins primaires cultivés en monocouche.

3.3.4 Étude des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert, seuls ou en mélange, sur le métabolisme des chondrocytes humains

Après avoir investigué les effets des actifs nutritionnels sur des chondrocytes primaires bovins cultivés en monocouche, en présence d'IL-1 β ou non, nous avons étudié les effets des actifs sur le métabolisme des chondrocytes primaires humains cultivés en monocouche, en présence d'IL-1 β ou non. Les trois mêmes actifs nutritionnels C, O et T ont été testés à différentes concentrations et en combinaison, en présence d'IL-1 β ou non. Les mêmes gammes de concentrations que pour les chondrocytes bovins ont d'abord été appliquées sur les chondrocytes humains. Rapidement, nous nous sommes aperçus que ces concentrations étaient trop élevées pour les chondrocytes humains et induisaient une mortalité cellulaire importante. Pour cette raison, nous avons réalisé quelques mises au point supplémentaires et avons déterminé pour les chondrocytes humains une gamme de concentrations des actifs variant de 1 à 4 $\mu\text{g/ml}$. Par ailleurs, les effets des actifs nutritionnels (C et COT) sur la voie de signalisation NF- κB induite par l'IL-1 β ont été recherchés.

3.3.4.1 Les paramètres inflammatoires

3.3.4.1.1 Production de nitrite

En l'absence d'IL-1 β , la production de NO₂ avec tous les actifs nutritionnels, seuls ou en combinaison, à toutes les concentrations, était indétectable.

L'IL-1 β stimulait la production de NO₂ ($37,92 \pm 6,04$ nmole/ μg d'ADN, $p=0,003$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C à la concentration de 4 $\mu\text{g/ml}$ ($2,75 \pm 2,75$ nmole/ μg d'ADN, $p<0,001$) et O à la concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$ ($24,87 \pm 2,96$ nmole/ μg d'ADN, $p=0,039$) inhibaient significativement la production de NO₂. T n'avait pas d'effet sur ce paramètre. Le mélange COT diminuait significativement la production de NO₂ aux concentrations de 2:2:2 ($17,74 \pm 4,72$ nmole/ μg d'ADN, $p<0,001$) et 4:4:4 $\mu\text{g/ml}$ ($1,65 \pm 1,15$ nmole/ μg d'ADN, $p<0,001$). À la concentration de 4:4:4 $\mu\text{g/ml}$, les effets de C et de COT étaient semblables. Cependant, à la concentration de 2:2:2 $\mu\text{g/ml}$, COT avait un effet inhibiteur plus important que O (Figure 63).

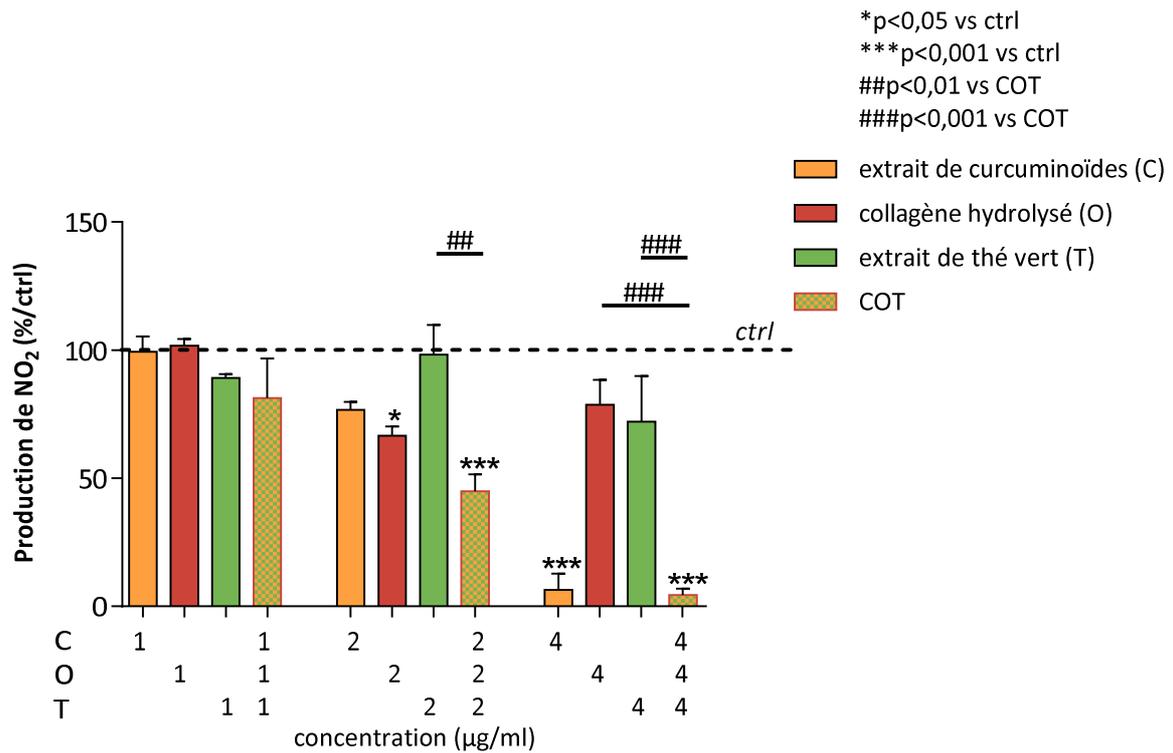


Figure 63. Production de NO₂ par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1β, lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 µg/ml.

3.3.4.1.2 Production d'interleukine-6

En l'absence d'IL-1β, la production d'IL-6 était de 232,32 ± 85,3 pg/µg d'ADN. Les trois actifs, seuls, n'avaient pas d'effet sur la production basale d'IL-6. À la concentration de 1:1:1 µg/ml, le mélange COT inhibait la production basale d'IL-6 (108,09 ± 43,17 pg/µg d'ADN, p=0,038) (Figure 64).

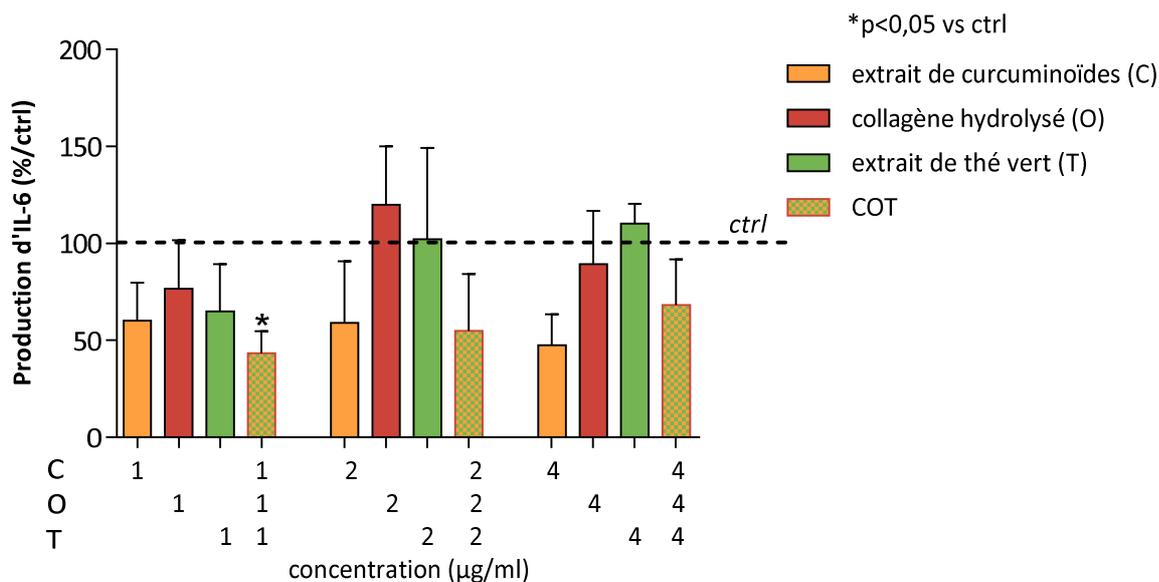


Figure 64. Production d'IL-6 par les chondrocytes humains en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 µg/ml.

L'IL-1 β stimulait significativement la production d'IL-6 ($374153,98 \pm 55870,58$ pg/ μ g d'ADN, $p=0,003$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C aux concentrations de 2 et 4 µg/ml inhibait significativement la production d'IL-6 (2 µg/ml: $198865,78 \pm 51036,33$ pg/ μ g d'ADN, $p=0,003$; 4 µg/ml: $26185,84 \pm 9712,2$ pg/ μ g d'ADN, $p<0,001$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre. Le mélange COT diminuait significativement la production d'IL-6 aux concentrations de 1:1:1 ($238658,42 \pm 61332,79$ pg/ μ g d'ADN, $p=0,026$), 2:2:2 ($165110,45 \pm 22791,39$ pg/ μ g d'ADN, $p<0,001$) et 4:4:4 µg/ml ($28127,75 \pm 6569,56$ pg/ μ g d'ADN, $p<0,001$). Les trois actifs ajoutés individuellement à la concentration de 1 µg/ml n'avaient pas d'effet sur la production d'IL-6 alors que le mélange COT réduisait significativement la production d'IL-6 à cette concentration. Cependant, aux concentrations de 2:2:2 et de 4:4:4 µg/ml, il n'y avait pas d'effet additif de COT par rapport à l'effet de C seul (Figure 65).

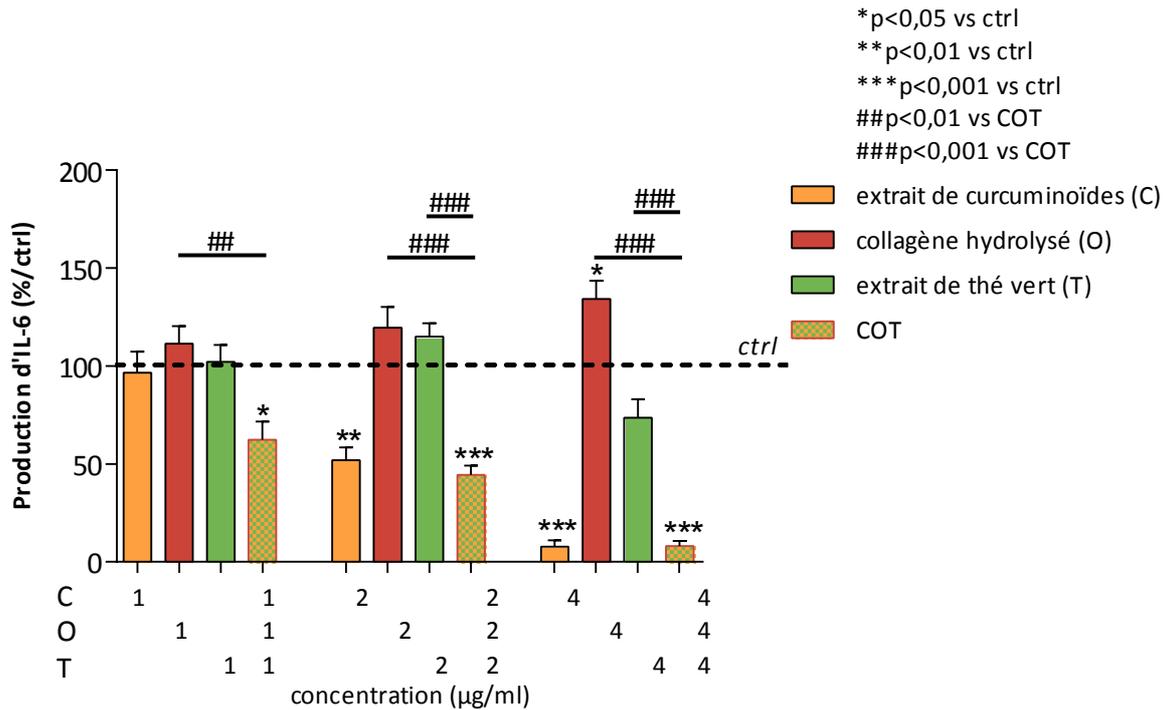


Figure 65. Production d'IL-6 par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.4.2 Les paramètres cataboliques

3.3.4.2.1 Production de métalloprotéase matricielle-3

En l'absence d'IL-1 β , la production de MMP-3 était de $207,34 \pm 15,83 \text{ ng}/\mu\text{g}$ d'ADN. C aux concentrations de 2 et 4 $\mu\text{g/ml}$ diminuait significativement la production de MMP-3 (2 $\mu\text{g/ml}$: $151,86 \pm 19,03 \text{ ng}/\mu\text{g}$ d'ADN, $p=0,017$; 4 $\mu\text{g/ml}$: $92,84 \pm 19,49 \text{ ng}/\mu\text{g}$ d'ADN, $p<0,001$). O et T n'avaient pas d'effet sur la production basale de MMP-3. Le mélange COT inhibait significativement la production basale de MMP-3 aux concentrations de 1:1:1 ($139,1 \pm 30,13 \text{ ng}/\mu\text{g}$ d'ADN, $p=0,011$), 2:2:2 ($110,95 \pm 20,97 \text{ ng}/\mu\text{g}$ d'ADN, $p<0,001$) et 4:4:4 $\mu\text{g/ml}$ ($78,03 \pm 14,85 \text{ ng}/\mu\text{g}$ d'ADN, $p<0,001$). À la concentration de 1:1:1 $\mu\text{g/ml}$, le mélange COT inhibait la production basale de MMP-3 alors que les actifs pris individuellement n'avaient pas d'effet significatif (Figure 66).

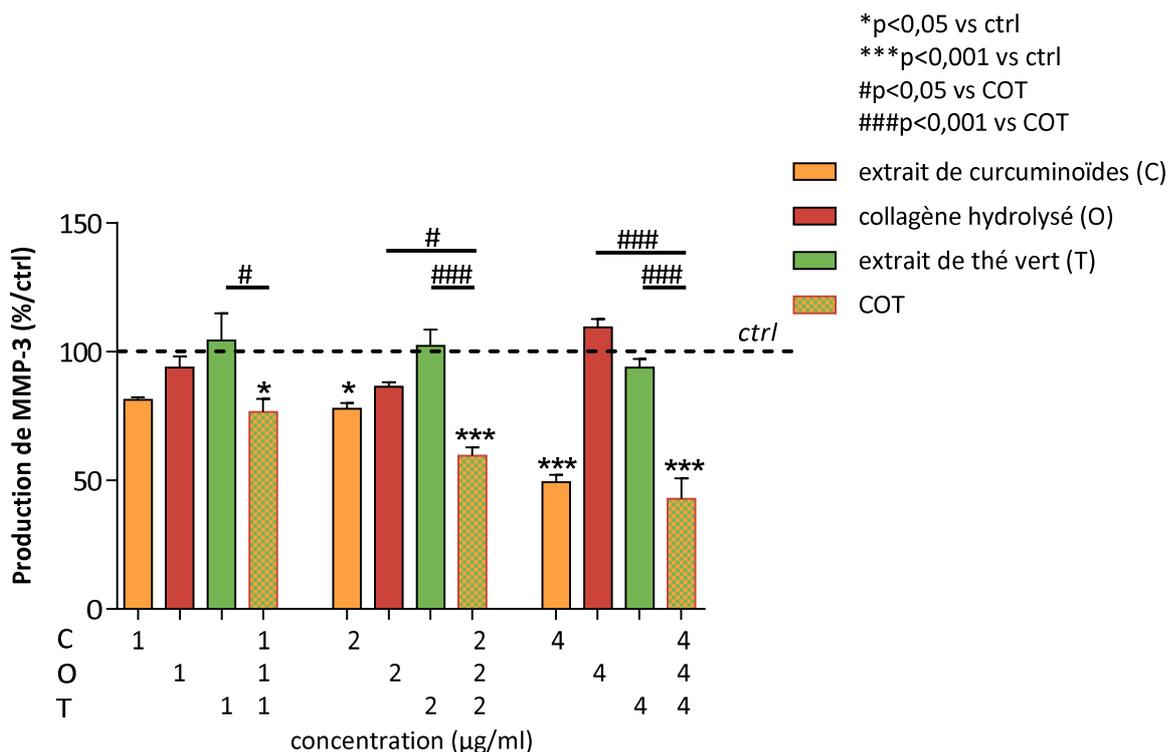


Figure 66. Production de MMP-3 par les chondrocytes humains en conditions basales, lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 µg/ml.

L'IL-1 β stimulait significativement la production de MMP-3 ($2839,88 \pm 661,96$ ng/ μ g d'ADN, $p=0,016$). Lorsque les chondrocytes étaient stimulés à l'IL-1 β , C à la concentration de 4 µg/ml inhibait significativement la production de MMP-3 ($946,97 \pm 254,48$ ng/ μ g d'ADN, $p=0,024$). O et T n'avaient pas d'effet sur ce paramètre. Le mélange COT à la concentration de 4:4:4 µg/ml diminuait significativement la production de MMP-3 ($863,56 \pm 181,07$ ng/ μ g d'ADN, $p=0,012$), mais cet effet n'était pas supérieur à celui de C seul (Figure 67).

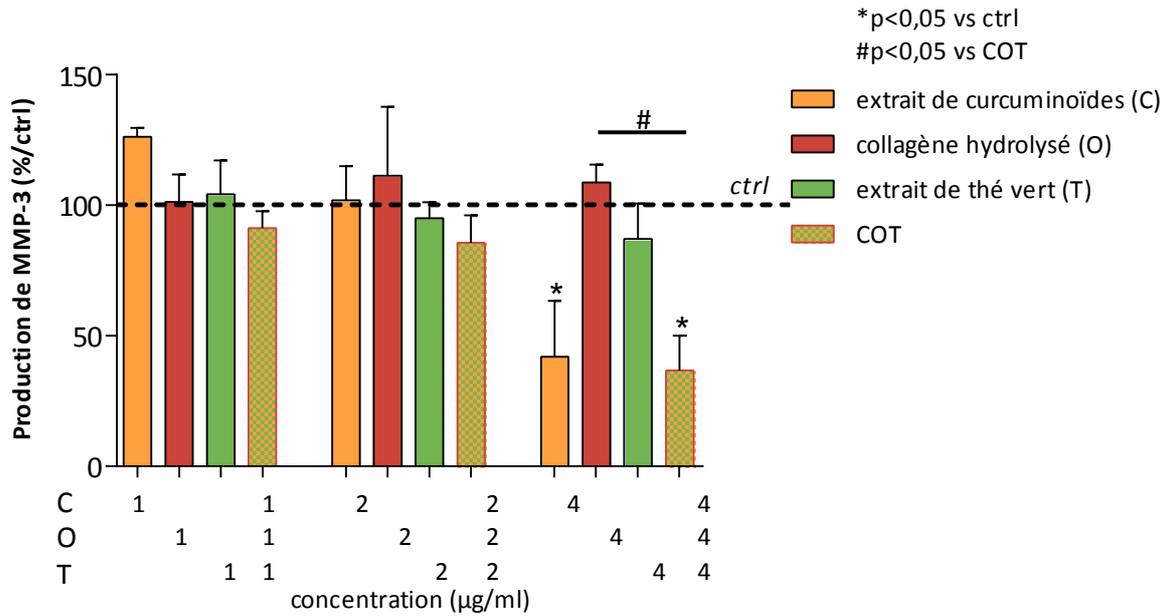


Figure 67. Production de MMP-3 par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β , lorsqu'ils étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.4.3 Les paramètres anaboliques

3.3.4.3.1 Production d'agrécane

En l'absence d'IL-1 β , le contenu en AGG dans les surnageants de culture était de $538 \pm 86,48$ ng/ μg d'ADN. Le contenu en AGG dans les extraits cellulaires était de $28,92 \pm 4,61$ ng/ μg d'ADN, soit 18,6 fois inférieur au contenu en AGG des surnageants de culture. C à la concentration de 4 $\mu\text{g/ml}$ diminuait significativement le contenu en AGG dans les surnageants de culture ($214,87 \pm 41,34$ ng/ μg d'ADN, $p=0,023$), mais n'avait pas d'effet sur le contenu en AGG dans les extraits cellulaires. O et T n'avaient pas d'effet sur le contenu basal en AGG. Le mélange COT à la concentration de 4:4:4 $\mu\text{g/ml}$ diminuait significativement le contenu en AGG dans les surnageants de culture ($192,91 \pm 45,98$ ng/ μg d'ADN, $p=0,013$) et n'avait pas d'effet significatif sur le contenu en AGG des extraits cellulaires. C et COT avaient un effet similaire sur le contenu en AGG dans les surnageants de culture (Figure 68).

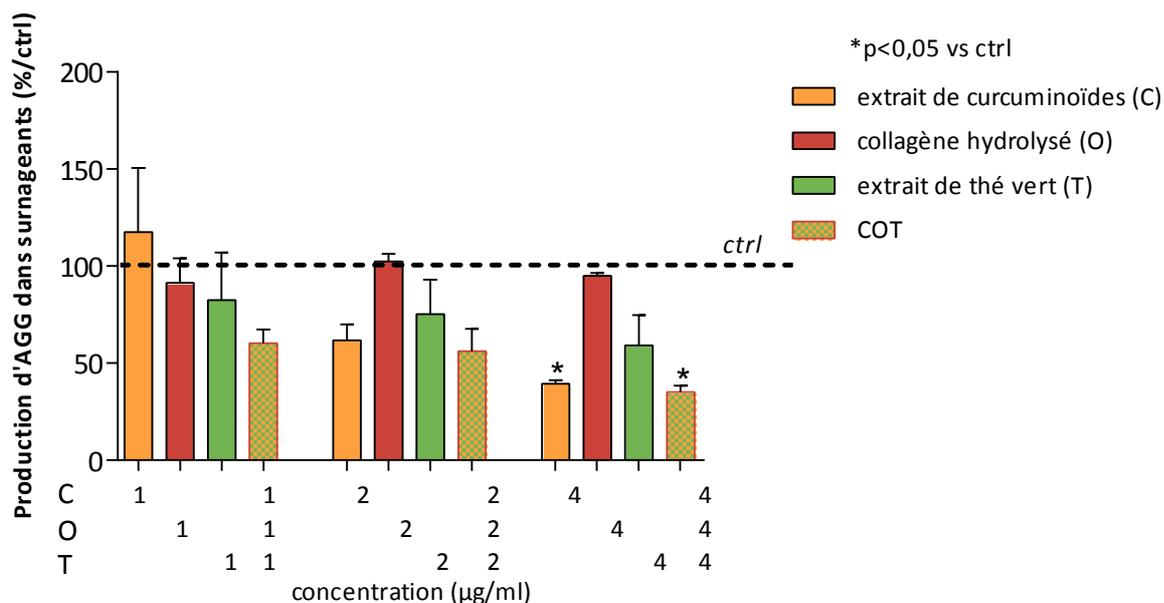


Figure 68. Contenu en AGG dans les surnageants de culture de chondrocytes humains en conditions basales, lorsque ceux-ci étaient mis en présence d'extrait de curcuminoïdes, collagène hydrolysé et extrait de thé vert, seuls ou en combinaison, à la concentration de 1, 2 ou 4 µg/ml.

L'IL-1 β diminuait le contenu en AGG dans les surnageants de culture ($139,29 \pm 34,27$ ng/ μ g d'ADN, $p=0,013$). L'IL-1 β ne modifiait pas significativement le contenu en AGG dans les extraits cellulaires ($28,92 \pm 4,61$ ng/ μ g d'ADN en absence d'IL-1 β vs $26,47 \pm 10,62$ ng/ μ g d'ADN en présence d'IL-1 β , $p=0,842$). Les actifs, seuls ou en combinaison, n'avaient pas d'effet sur ces paramètres.

3.3.4.4 Résumé

La concentration optimale des actifs nutritionnels agissant sur la synthèse des marqueurs de l'inflammation, du catabolisme et de l'anabolisme était de 4 µg/ml (Tableaux 14 et 15). En effet, C et le mélange COT à la concentration de 4 µg/ml diminuaient la production basale de MMP-3 (Tableau 14). De plus, C et le mélange COT à la concentration de 4 µg/ml inhibaient la production de NO₂, IL-6, MMP-3 par les chondrocytes stimulés à l'IL-1 β . Le contenu en AGG dans les surnageants était également diminué par C et le mélange COT à la concentration de 4 µg/ml (Tableau 15).

Tableau 14. Résumé des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert, seuls ou en mélange, sur le métabolisme des chondrocytes humains en conditions basales.

		Production			
		Inflammation		Catabolisme	
		NO ₂	IL-6	MMP-3	AGG (surnageants)
C	1 µg/ml				
	2 µg/ml			*	
	4 µg/ml			***	*
O	1 µg/ml				
	2 µg/ml				
	4 µg/ml				
T	1 µg/ml				
	2 µg/ml				
	4 µg/ml				
COT	1:1:1 µg/ml		*	*	
	2:2:2 µg/ml			***	
	4:4:4 µg/ml			***	*

Les étoiles vertes représentent un effet favorable significatif. Les étoiles noires représentent un effet significatif discuté. *p<0,05 ***p<0,001. C=extrait de curcuminoïdes, O=collagène hydrolysé, T=extrait de thé vert, NO₂=nitrite, IL-6=interleukine-6, MMP-3=metalloprotéase matricielle-3, AGG=agrécane.

Tableau 15. Résumé des effets de concentrations croissantes de l'extrait de curcuminoïdes, du collagène hydrolysé et de l'extrait de thé vert, seuls ou en mélange, sur le métabolisme des chondrocytes humains en présence d'IL-1β.

		Production			
		Inflammation		Catabolisme	
		NO ₂	IL-6	MMP-3	AGG (surnageants)
C	1 µg/ml				
	2 µg/ml		**		
	4 µg/ml	***	***	*	
O	1 µg/ml				
	2 µg/ml	*			
	4 µg/ml				
T	1 µg/ml				
	2 µg/ml				
	4 µg/ml				
COT	1:1:1 µg/ml		*		
	2:2:2 µg/ml	***	***		
	4:4:4 µg/ml	***	***	*	

Les étoiles vertes représentent un effet favorable significatif. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001. C=extrait de curcuminoïdes, O=collagène hydrolysé, T=extrait de thé vert, NO₂=nitrite, IL-6=interleukine-6, MMP-3=metalloprotéase matricielle-3, AGG=agrécane.

Les chondrocytes humains cultivés en monocouche ont été observés au microscope. Les différents actifs nutritionnels, de même que la présence d'IL-1β ou non, n'influençaient pas la morphologie des chondrocytes (Figure 69).

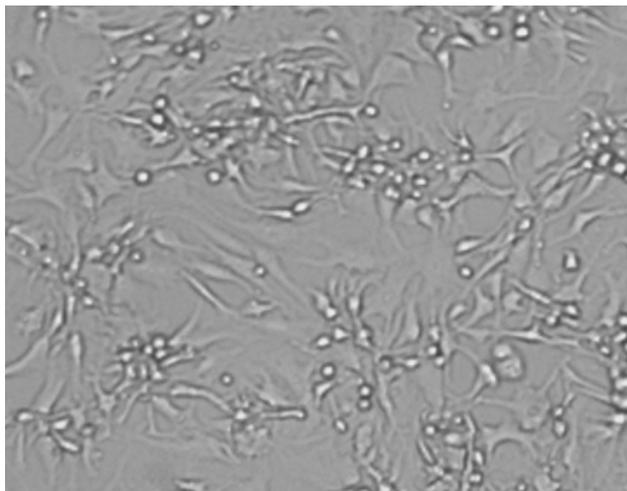


Figure 69. Photographie de chondrocytes humains primaires cultivés en monocouche.

3.3.4.5 Voie de signalisation NF- κ B

Nous avons ensuite étudié les effets de C et de COT sur l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, induite par l'IL-1 β sur les chondrocytes arthrosiques humains. Les chondrocytes étaient prétraités pendant 24 h avec C ou COT et ensuite co-traités ou non avec l'IL-1 β (10^{-11} M) pendant 5 ou 15 min. La phosphorylation de la sous-unité NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65) était inhibée par C et COT. Pour examiner si l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B induite par l'IL-1 β était due à l'inhibition de la dégradation d'I κ B α , la production de la sous-unité I κ B α phosphorylée (p-I κ B α) a également été observée. L'IL-1 β induisait la dégradation et la phosphorylation d'I κ B α dès 5 min de traitement. Cependant, le prétraitement avec C ou COT empêchait la dégradation de la sous-unité I κ B α et donc l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (Figure 70).

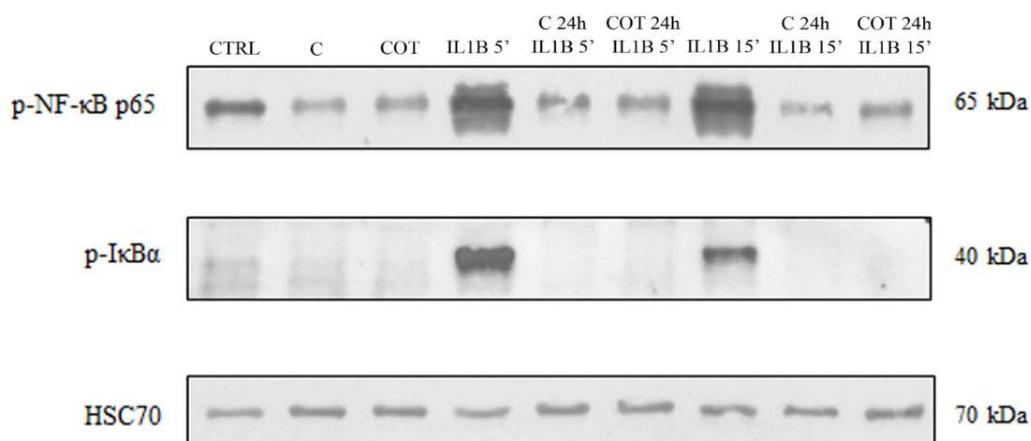


Figure 70. Analyse par immunotransfert de protéines des effets des actifs nutritionnels C et COT sur les phosphorylations des sous-unités NF- κ B p65 et I κ B α , induites par l'IL-1 β .

Nous avons choisi de continuer notre étude avec le mélange COT, car :

- il montrait des effets additifs sur la synthèse de NO₂, IL-6, iNOS et ADAMTS4 ;
- il induisait des effets synergiques bénéfiques sur la synthèse de COX2, MMP-3, ADAMTS5 et AGG ;
- il avait des effets significativement supérieurs à ceux de C seul sur l'expression de COX2, MMP-3 et AGG.

3.3.5 Analyse génétique sur biopuces à ADN

Sur les chondrocytes humains, la concentration du mélange COT active sur le plus grand nombre de paramètres était de 4:4:4 µg/ml. Ce cocktail était ajouté aux chondrocytes primaires humains en présence d'IL-1β ou non. L'objectif de l'analyse sur biopuces à ADN était d'identifier des gènes différemment exprimés en présence ou en absence du mélange d'actifs, et en présence d'IL-1β ou non, et par conséquent de nouvelles cibles.

Parmi les 34602 sondes d'ADN présentes sur la puce Illumina, 4168 étaient filtrées selon les conditions décrites dans le matériel et méthodes. L'analyse différentielle au niveau de signification statistique sélectionné dans le menu t-test du logiciel BRB ArrayTools ($p < 0,001$) mettait en évidence 2549 gènes différemment exprimés entre les conditions ctrl et IL-1β, 2280 gènes différemment exprimés entre les conditions IL-1β et COT IL-1β, et 1907 gènes différemment exprimés entre les conditions ctrl et COT. Nous considérons un gène comme différemment exprimé si sa variation d'expression entre deux conditions était comprise entre 0,5 et 2 (IL-1β/ctrl, COT IL-1β/IL-1β et COT/ctrl). Dans un souci de clarté, nous avons choisi d'écrire, pour les gènes sous-exprimés, les résultats avec l'inverse du ratio 0,5, soit -2. Ces valeurs correspondent au « *fold change* » d'expression. Le test de comparaison de classes entre les conditions ctrl et IL-1β distinguait 552 gènes surexprimés et 297 gènes sous-exprimés. Le test de comparaison de classes entre les conditions IL-1β et COT IL-1β révélait 424 gènes surexprimés et 577 gènes sous-exprimés. Enfin, le test de comparaison de classes entre les conditions ctrl et COT décrivait 323 gènes surexprimés et 259 gènes sous-exprimés (Figure 71).

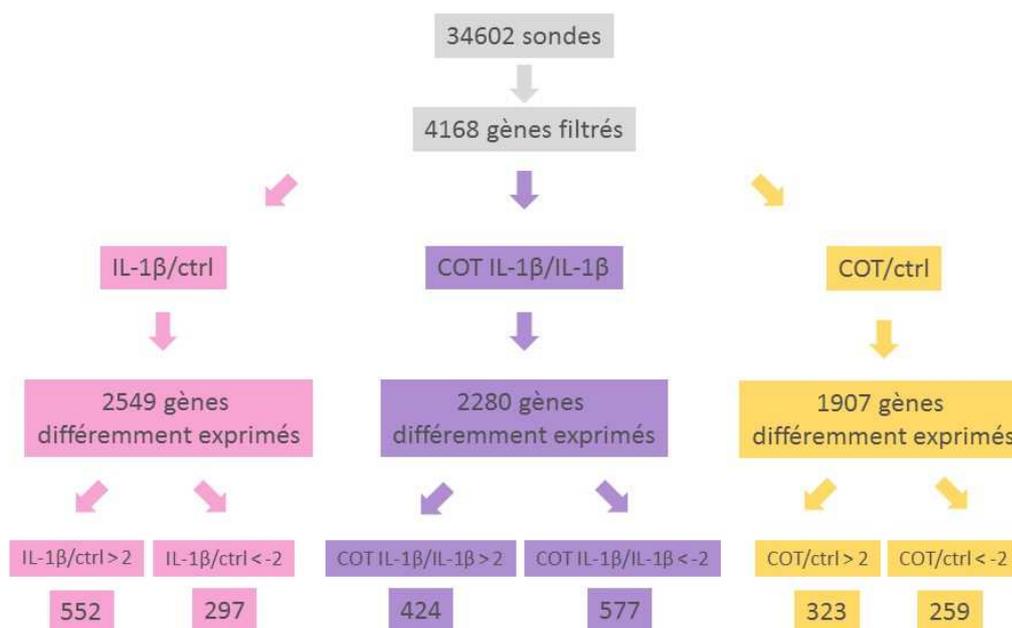


Figure 71. Tests de comparaison de classes entre les quatre conditions de l'analyse des biopuces à ADN (ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β).

3.3.5.1 Gènes et protéines d'intérêt

La pertinence biologique des gènes différemment exprimés entre les conditions ctrl et IL-1 β ; IL-1 β et COT IL-1 β ; ctrl et COT était déterminée grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis. Notre objectif était d'identifier des cibles impliquées dans les voies de signalisation spécifiques de l'arthrose. La majorité des gènes qui étaient différemment exprimés entre les conditions ctrl, COT, IL-1 β et COT IL-1 β étaient catégorisés comme appartenant aux voies clés de l'inflammation, du métabolisme du cartilage (catabolisme et anabolisme) et de l'angiogenèse (Tableau 16). Nous avons analysé ces voies clés en détail.

Tableau 16. Gènes différemment exprimés entre les conditions IL-1 β et ctrl, COT IL-1 β et IL-1 β , COT et ctrl. Les gènes ayant les « *fold change* » d'expression les plus élevés sont représentés et catégorisés comme appartenant aux voies clés de l'inflammation, du métabolisme du cartilage et de l'angiogenèse.

IL-1β/ctrl		
Voies clés spécifiques de l'arthrose	Gènes surexprimés	Gènes sous-exprimés
Inflammation		
Cytokines	IL8 (126,58) ; IL6 (109,89) ; TNFAIP6 (29,41) ; IFI44L (8,33)	IL11RA (-3,2) ; CYTL1 (-3,12)
Chimiokines	CXCL6 (104,17) ; CCL20 (100) ; CXCL1 (83,33) ; CCL8 (47,62) ; CXCL2 (33,33) ; CCL5 (33,33) ; CXCL5 (17,86) ; CXCL10 (10,2) ; CCL2 (10)	
Enzymes	NOS2A (50) ; SOD2 (31,25) ; PTGS2 (31,25) ; PTGES (19,61)	GPX3 (-4,47) ; DDAH1 (-4,16) ; GSTM2 (-3,53) ; GSTM1 (-3,24)
Autres	LCN2 (16,67) ; IER3 (16,13) ; NFKBIA (11,49) ; CFB (10,87) ; NFKBIZ (8,33)	
Anabolisme	BMP2 (8,33) ; BMP6 (4)	CTGF (-13,62) ; GREM1 (-7,62) ; FGFR3 (-3,02) ; BMP4 (-2,76) ; CILP (-2,12)
Catabolisme	MMP13 (23,26) ; MMP1 (9,09) ; CTSS (2,33)	ADAMTS1 (-3,91)
Angiogenèse	ECGF1 (7,69) ; RCAN1 (4,17) ; STC1 (3,33) ; BDKRB1 (3,03) ; AQP9 (2,86) ; HBEGF (2,04)	ANGPTL2 (-5,94) ; VEGFB (-2,51)
COT IL-1β/IL-1β		
Voies clés spécifiques de l'arthrose	Gènes surexprimés	Gènes sous-exprimés
Inflammation		
Cytokines		C1QTNF1 (-17,54) ; IL6 (-13,7) ; IFIT1 (-13,7) ; TNFAIP6 (-5,56) ; IL8 (-3,13)
Chimiokines		CXCL6 (-52,63) ; CCL8 (-31,25) ; CXCL5 (-12,66) ; CXCL1 (-10,20) ; CXCL2

		(-10) ; CCL5 (-8,33) ; CXCL10 (-8,33) ; CCL3L3 (-5,26) ; CCL2 (-5,26) ; CCL3 (-4,55) ; CCL3L1 (-3,13) ; CCL20 (-2,94) ; CCL7 (-2,86) ; CCL13 (-2,38)
Enzymes	GPX3 (2,89)	NOS2A (-24,39) ; PTGES (-14,08) ; PTGS2 (-5,56)
Autres	ZFP36 (4,08) ; ULBP1 (3,7) ; SNIP1 (3,54) ; CD83 (2,33)	
Anabolisme	CTGF (3,54)	FGF2 (-5,56) ; BMP2 (-3,85) ; BMP6 (-3,45)
Catabolisme		MMP13 (-12,82) ; MMP1 (-3,33) ; ADAMTS5 (-3,23) ; ADAMTS9 (-3,03)
Angiogenèse	SERPIN E1 (4,28) ; SERPIN C1 (2,45) ; HBEGF (2,05)	ECGF1 (-7,14) ; VCAM1 (-3,85) ; STC1 (-3,7) ; TFPI2 (-3,45) ; FBLN5 (-2,94) ; BDKRB1 (-2,7) ; PAFAH1B1 (-2,13) ; VEGFC (-2,08) ; SERPIN A1 (-2,08)
COT/ctrl		
Voies clés spécifiques de l'arthrose	Gènes surexprimés	Gènes sous-exprimés
Inflammation		
Cytokines		C1QTNF1 (-1,45)
Chimiokines		CCL2 (-2,5)
Enzymes	PTGS2 (2,77)	
Autres	ULBP1 (4,56)	
Anabolisme	GDF15 (8,07)	IGFBP5 (-4,35)
Catabolisme		ADAMTS5 (-4,00) ; ADAMTS1 (-3,23)
Angiogenèse	HBEGF (4) ; SERPIN E1 (3,1) ; SERPIN C1 (2,52) ; RCAN1 (2,51)	ANGPTL2 (-4,17) ; VCAM1 (-4) ; BMPER (-2,08)

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux « *fold change* » d'expression.

3.3.5.1.1 Inflammation

Plusieurs centaines de médiateurs de l'inflammation étaient surexprimés par l'IL-1 β . La plupart de ces facteurs stimulés par l'IL-1 β étaient inhibés par COT. Ces médiateurs appartenait à différentes catégories : cytokines inflammatoires, chimiokines et enzymes. Peu de médiateurs inflammatoires étaient exprimés en l'absence d'une stimulation à l'IL-1 β . La chimiokine la plus fortement régulée était CXCL6. Cette chimiokine était fortement surexprimée par l'IL-1 β (104,17 fois, $p < 10^{-7}$) et fortement inhibée par COT (-52,63 fois, $p < 10^{-7}$).

Pour valider l'expression différentielle de CXCL6 par les chondrocytes humains arthrosiques, nous avons mesuré, grâce à un dosage immunologique, la production de la protéine CXCL6 dans les milieux de culture conditionnés. Le niveau de production protéique de CXCL6 était significativement augmenté par l'IL-1 β (ctrl : $86,2 \pm 52,9$ pg/ μ g d'ADN, IL-1 β : $28245,4 \pm 4934,7$ pg/ μ g d'ADN, $p < 0,001$). L'effet stimulant de l'IL-1 β était significativement, pratiquement totalement, inhibé par COT ($185,9 \pm 114,6$ pg/ μ g d'ADN, $p < 0,001$) (Figure 72).

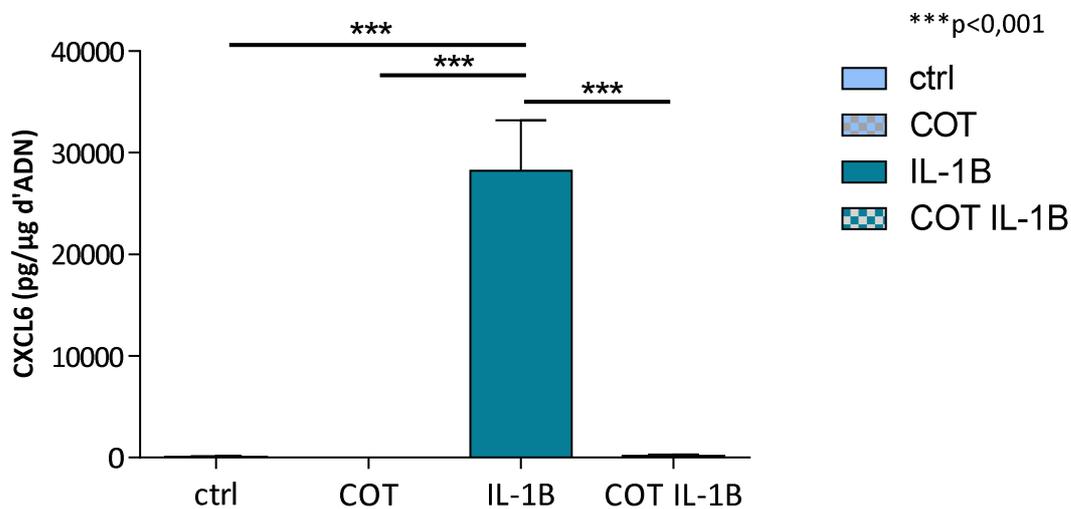


Figure 72. Production de CXCL6 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β . Les résultats sont exprimés avec la moyenne \pm SEM de douze expériences indépendantes réalisées avec des chondrocytes provenant de douze patients différents.

3.3.5.1.2 Métabolisme du cartilage

La comparaison de classes entre les différentes conditions a mis en évidence plusieurs facteurs impliqués dans le catabolisme ou l'anabolisme du cartilage. Les gènes les plus stimulés par l'IL-1 β étaient MMP-13 dans la voie catabolique (23,26 fois, $p < 10^{-7}$) et BMP-2 dans la voie anabolique (8,33 fois, $p < 10^{-7}$). L'expression de ces deux gènes était inhibée par COT (MMP-13 : -12,82 fois, $p < 10^{-7}$ et BMP-2 : -3,85 fois, $p = 8,79 \times 10^{-5}$). Ces observations étaient confirmées au niveau protéique.

La production de MMP-13 était significativement augmentée par l'IL-1 β (ctrl : $3033,8 \pm 875,2$ pg/ μ g d'ADN, IL-1 β : $87115,8 \pm 12806,2$ pg/ μ g d'ADN, $p < 0,001$), mais cet effet était fortement inhibé par COT ($4910 \pm 1621,6$ pg/ μ g d'ADN, $p < 0,001$) (Figure 73).

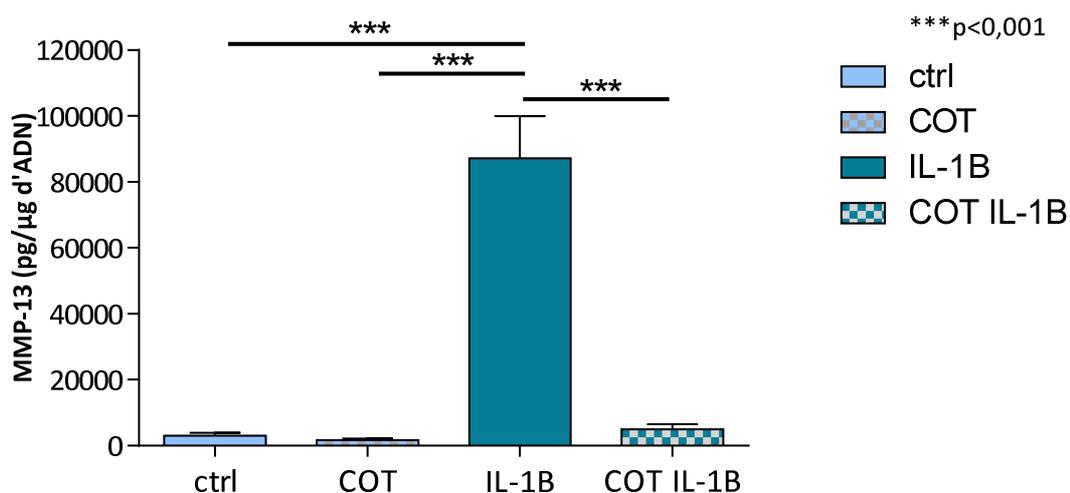


Figure 73. Production de MMP-13 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β . Les résultats sont exprimés avec la moyenne \pm SEM de douze expériences indépendantes réalisées avec des chondrocytes provenant de douze patients différents.

La production protéique de BMP-2 était indétectable en conditions basales. Cependant, l'IL-1 β augmentait la production de BMP-2 ($91,6 \pm 11,8$ pg/ μ g d'ADN). COT inhibait la production de BMP-2 stimulée par l'IL-1 β ($38,3 \pm 8,6$ pg/ μ g d'ADN, $p = 0,001$) (Figure 74).

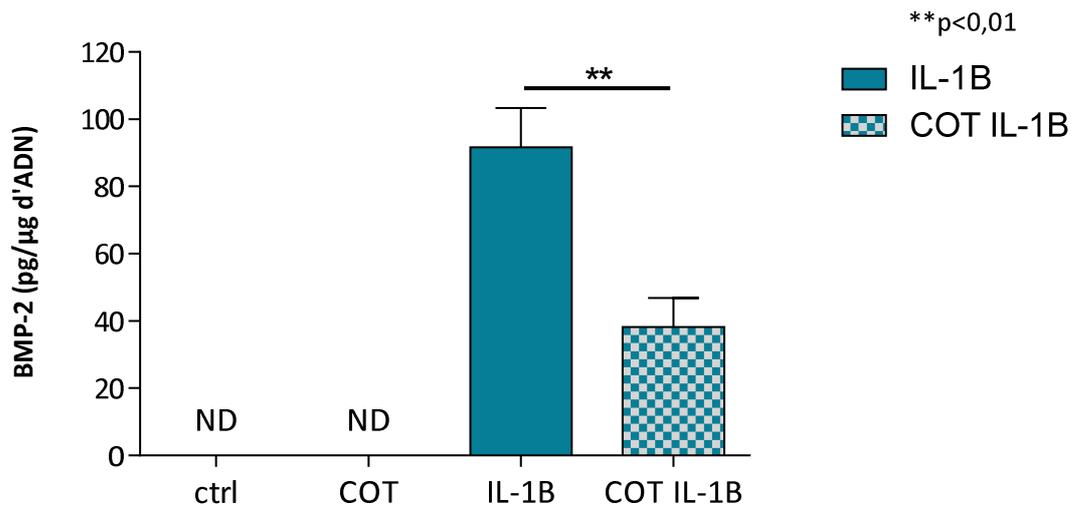


Figure 74. Production de BMP-2 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β . Les résultats sont exprimés avec la moyenne \pm SEM de douze expériences indépendantes réalisées avec des chondrocytes provenant de douze patients différents. ND=non détectable.

3.3.5.1.3 Angiogenèse

L'expression du gène STC1 était stimulée par l'IL-1 β (3,33 fois, $p=3 \times 10^{-7}$). Cet effet stimulant de l'IL-1 β était inhibé par COT (-3,7 fois, $p=4,1 \times 10^{-6}$). En l'absence d'IL-1 β , l'expression du gène serpine E1 était augmentée par le mélange COT (3,1 fois, $p=1,2 \times 10^{-6}$). L'IL-1 β n'affectait pas l'expression de la serpine E1. Cependant, en présence d'IL-1 β , l'expression du gène serpine E1 était stimulée par le mélange COT (4,28 fois, $p=2,25 \times 10^{-5}$).

La production de STC1 était induite par l'IL-1 β (ctrl : $268,6 \pm 62,3$ pg/ μ g d'ADN, IL-1 β : $819,3 \pm 167,4$ pg/ μ g d'ADN, $p=0,005$). Cet effet stimulant de l'IL-1 β était significativement inhibé par COT ($67,7 \pm 47,9$ pg/ μ g d'ADN, $p<0,001$), à un niveau significativement inférieur au niveau de production basale de STC1 ($p=0,018$). De plus, COT diminuait significativement la production de STC1 en conditions basales ($78,8 \pm 52,8$ pg/ μ g d'ADN, $p=0,03$) (Figure 75).

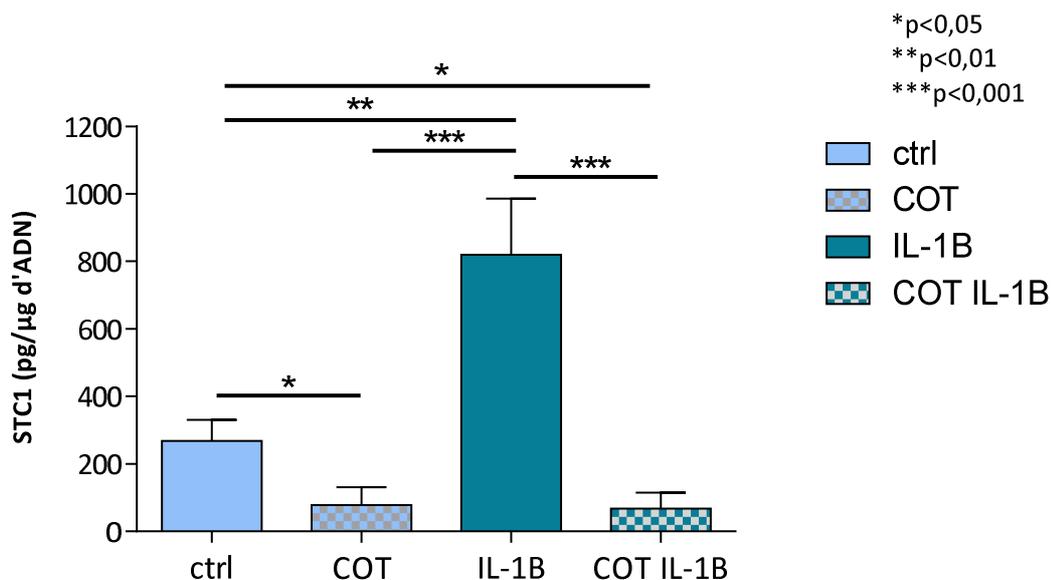


Figure 75. Production de STC1 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β . Les résultats sont exprimés avec la moyenne \pm SEM de douze expériences indépendantes réalisées avec des chondrocytes provenant de douze patients différents.

La production de la protéine serpine E1 était inhibée par l'IL-1 β (ctrl : $0,85 \pm 0,11$ ng/ μ g d'ADN, IL-1 β : $0,35 \pm 0,06$ ng/ μ g d'ADN, $p < 0,001$). La présence de COT dans le milieu de culture bloquait complètement l'effet inhibiteur de l'IL-1 β ($0,75 \pm 0,16$ ng/ μ g d'ADN, $p = 0,028$) (Figure 76).

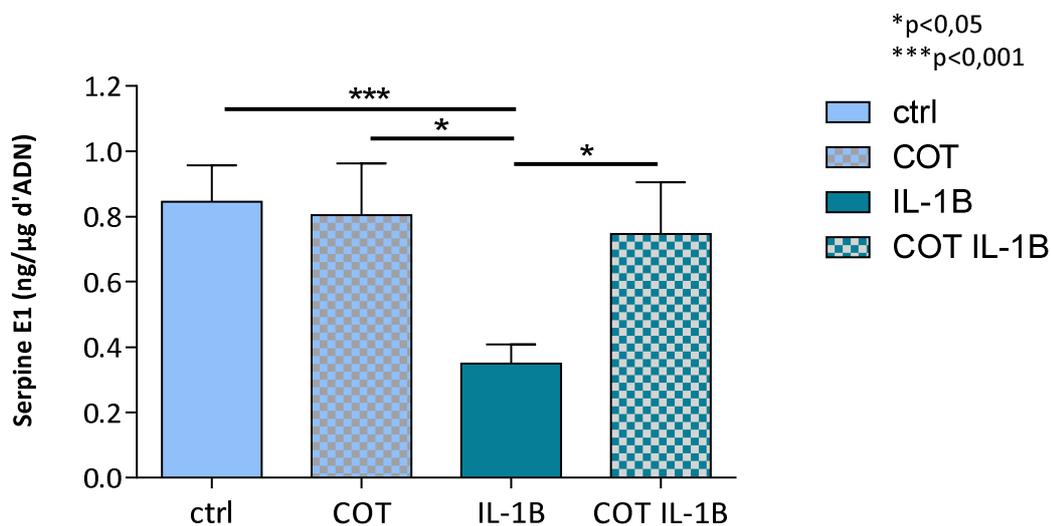


Figure 76. Production de serpine E1 par les chondrocytes humains dans les conditions ctrl, IL-1 β , COT et COT IL-1 β . Les résultats sont exprimés avec la moyenne \pm SEM de douze expériences indépendantes réalisées avec des chondrocytes provenant de douze patients différents.

3.4 Discussion

De nombreux médiateurs interviennent dans les mécanismes moléculaires associés à la progression de l'arthrose [271]. Parmi ces médiateurs, certaines cytokines telles que l'IL-1 β jouent un rôle clé, en stimulant la production de médiateurs impliqués dans la dégradation du cartilage et l'inflammation de la membrane synoviale [272]. *In vitro*, l'IL-1 β stimule fortement la synthèse des enzymes impliquées dans la dégradation du cartilage et elle inhibe la synthèse des principaux constituants de la matrice extracellulaire. Elle permet de reproduire *in vitro* le déséquilibre métabolique observé *in vivo* au niveau du cartilage. En effet, l'IL-1 β augmente la production par les chondrocytes d'un large spectre d'enzymes protéolytiques telles qu'ADAMTS4, ADAMTS5, MMP-3, et d'une variété de cytokines, incluant l'IL-6 et l'IL-8. Parallèlement, elle inhibe la synthèse du collagène de type II et de l'AGG [147, 273-275]. Pour ces raisons, nous avons traité les chondrocytes primaires bovins ou humains avec l'IL-1 β afin de mimer le métabolisme des chondrocytes en conditions pathologiques. Hormis l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 sont aussi capables de promouvoir la dégradation de la matrice extracellulaire cartilagineuse ou d'agir avec d'autres cytokines pour amplifier et accélérer la destruction du cartilage [147, 271]. Dans nos expérimentations, comme attendu, la stimulation des chondrocytes par l'IL-1 β induisait l'expression des gènes COX2, iNOS, ADAMTS4 et ADAMTS5 et la production de NO₂ et de PGE₂. De plus, l'IL-1 β induisait significativement l'expression génique et la production protéique d'IL-6 et d'MMP-3, et réduisait significativement l'expression génique et la production protéique des AGG.

Nous avons démontré que C avait des effets bénéfiques sur les chondrocytes. En effet, C contrecarrait les effets délétères de l'IL-1 β sur les chondrocytes. Plus précisément, C réduisait l'effet stimulant de l'IL-1 β sur les médiateurs pro-inflammatoires et pro-cataboliques tels que les cytokines, NO₂ ou MMP-3. Ces effets étaient opérés via l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B. C inhibait l'activation d'NF- κ B induite par l'IL-1 β et, par conséquent, empêchait sa translocation

vers le noyau chondrocytaire. De plus, C inhibait la dégradation de la sous-unité I κ B α induite par l'IL-1 β .

Nos résultats étaient cohérents avec ceux d'autres études démontrant que la curcumine supprimait l'activation de la voie NF- κ B induite par l'IL-1 β via l'inhibition de la phosphorylation d'I κ B α et de p65, empêchant dès lors la translocation d'NF- κ B dans le noyau et l'expression de gènes inflammatoires [247, 249]. En outre, d'autres études démontraient que la curcumine purifiée inhibait les productions de NO₂, PGE₂ et MMP-3, et l'expression des gènes IL-6 et IL-8 par les chondrocytes bovins et humains primaires, stimulés par l'IL-1 β [248, 250], en inhibant la phosphorylation d'I κ B α [276]. La curcumine est utilisée dans le traitement de la douleur et de l'inflammation dans de nombreuses conditions pathologiques comme la polyarthrite rhumatoïde ou l'arthrose [239, 246, 251, 277].

De plus, nous avons démontré que C réduisait significativement l'expression des gènes ADAMTS4 et ADAMTS5, deux enzymes directement impliquées dans le clivage des AGG. Nous avons également observé que C diminuait la production d'AGG, mais uniquement à plus forte dose. La diminution d'AGG dans le surnageant de la culture peut résulter d'une réduction de la synthèse d'AGG ou d'une diminution de la dégradation d'AGG. En effet, les anticorps utilisés dans le dosage immunologique ciblent les résidus « Kératane Sulfate » et la partie « *Hyaluronic Acid Binding Region* » de la protéine centrale. Le dosage permet par conséquent la reconnaissance de la protéine entière, mais également de la protéine après clivage enzymatique. Dès lors, une diminution de la dégradation des AGG réduit la quantité d'AGG mesurée dans le surnageant de culture. C inhibait l'expression des gènes ADAMTS sans affecter l'expression du gène AGG. Ceci supportait l'hypothèse que la diminution du contenu en AGG dans les surnageants de culture, induite par C, résultait d'une diminution de la dégradation des AGG. Le modèle de culture en monocouche n'est pas le meilleur modèle pour investiguer la production d'AGG et son accumulation dans la matrice extracellulaire. Il serait utile pour confirmer notre hypothèse de tester la curcumine sur des chondrocytes cultivés en trois dimensions dans une matrice naturelle comme, par exemple, l'alginate. La curcumine a déjà précédemment été évaluée sur des chondrocytes cultivés en billes d'alginate [250].

La curcumine n'avait pas d'effet sur la production d'AGG, ce qui confirme notre hypothèse selon laquelle la diminution du contenu en AGG observée dans les surnageants de culture résultait d'une inhibition de la dégradation des AGG.

O et T ont également montré des effets intéressants. O inhibait significativement l'expression de COX2 et MMP-3 par les chondrocytes bovins en conditions basales. O diminuait significativement la production de NO₂ par les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β . T diminuait significativement l'expression des gènes IL-6 et COX2 et la production de PGE₂ par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β .

Ces observations corroborent avec les résultats d'autres études suggérant que O et T avaient des effets bénéfiques sur le cartilage. En effet, il a été démontré que le peptide proline-hydroxyproline (pro-hyp), retrouvé majoritairement dans le sang humain après ingestion d'hydrolysats de collagène [278], augmentait le niveau d'expression des AGG par des chondrocytes murins [279]. De plus, les hydrolysats de collagène et le peptide pro-hyp inhibaient la différenciation des chondrocytes murins en chondrocytes hypertrophiques et augmentaient la production des GAG [279]. L'EGCG, la catéchine la plus abondante dans le thé vert, inhibait la réponse inflammatoire chez des chondrocytes humains [256]. D'autres données montraient que l'EGCG diminuait la production de TNF- α [255]. De manière consistante avec notre étude, il a été montré que l'EGCG seul inhibait l'expression de COX2 par des chondrocytes équins stimulés par des cytokines. Par ailleurs, l'EGCG en combinaison avec les ASU réduisait l'expression de COX2 à un niveau proche des contrôles et inhibait significativement la production de PGE₂ [280].

Ce qui était plus surprenant était l'absence d'effet du resvératrol sur la synthèse des médiateurs inflammatoires et cataboliques par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche. En effet, d'autres études ont montré que le resvératrol inhibait la synthèse de COX2, PGE₂ et des espèces réactives de l'oxygène par des chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β [281, 282]. La dégradation du cartilage induite par l'IL-1 β était aussi limitée par le resvératrol [283]. Le resvératrol inhibait également l'apoptose des chondrocytes [281, 284]. Nous pouvons expliquer ce contraste par des différences de doses entre ces études et la nôtre. En effet, des

concentrations dix à vingt fois plus importantes de resvératrol étaient utilisées dans ces études [281-283]. Nous avons investigué les effets du resvératrol uniquement sur le cartilage bovin alors que ces études étaient réalisées avec du cartilage humain. Ces cartilages d'origine distincte peuvent avoir un métabolisme différent. Par ailleurs, dans ces études, les chondrocytes étaient pré-traités avec le resvératrol pendant 1 h avant la stimulation à l'IL-1 β alors que nous avons incubé les chondrocytes avec le resvératrol et l'IL-1 β simultanément pendant 24 ou 48 h. Les récepteurs aux œstrogènes interviennent dans la réponse du resvératrol [285]. Nous émettons l'hypothèse que des doses plus importantes de resvératrol pourraient avoir des effets bénéfiques. Nous avançons que, à la dose utilisée, le resvératrol ne franchissait pas la membrane chondrocytaire. Il a par ailleurs été démontré que le resvératrol était plus efficace lorsqu'il était ajouté en combinaison avec un autre actif [286] tel que la curcumine par exemple [268, 276]. Le resvératrol reste donc une molécule intéressante dont il serait utile d'étudier *in vitro* la synergie avec d'autres actifs, notamment dans le but de développer un mélange d'actifs nutritionnels efficace dans la prise en charge de l'arthrose humaine.

Pour la première fois, nous avons étudié les effets de C, O et T en combinaison sur le métabolisme des chondrocytes [287]. Sur les chondrocytes bovins, les trois actifs montraient un effet inhibiteur additif sur l'expression des gènes IL-6, iNOS et ADAMTS4, stimulée par l'IL-1 β . De plus, les trois actifs agissaient en synergie pour inhiber l'expression des gènes COX2, MMP-3 et ADAMTS5, stimulée par l'IL-1 β . COT montrait un effet plus important sur la synthèse de COX2, MMP-3 et AGG que C seul. Sur les chondrocytes humains, COT avait un effet inhibiteur additif sur la production basale d'MMP-3 et sur la production de NO₂ stimulée par l'IL-1 β . De plus, COT avait un effet inhibiteur synergique sur la production d'IL-6 stimulée par l'IL-1 β . Ces observations justifient l'utilisation combinée de ces trois actifs.

Les concentrations d'IL-1 β et d'actifs nutritionnels n'étaient pas les mêmes sur les chondrocytes bovins et sur les chondrocytes humains. En effet, lorsque les chondrocytes humains étaient stimulés avec une concentration d'actifs nutritionnels supérieure à 12 μ g/ml, une mortalité cellulaire était observée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les chondrocytes humains étaient des chondrocytes arthrosiques alors

que les chondrocytes bovins étaient des chondrocytes sains. Concernant la concentration d'IL-1 β , 10⁻¹¹ M est la concentration physiologique retrouvée dans le fluide synovial de patients arthrosiques. Cependant, lorsque les chondrocytes bovins étaient stimulés avec 10⁻¹¹ M d'IL-1 β , on n'observait pas d'induction d'un stress inflammatoire. C'est pourquoi les chondrocytes bovins étaient stimulés avec une concentration d'IL-1 β dix fois plus importante que les chondrocytes humains.

Dans la suite de ce travail, nous avons étudié les mécanismes d'action des actifs via une approche génomique. Cette approche paraît prometteuse dans la compréhension de maladies complexes comme l'arthrose. L'implémentation de la génomique fonctionnelle est nécessaire pour augmenter la translation vers le développement de traitements et la prise en charge de maladies [288]. Des données génomiques s'avèrent utiles pour le développement éclairé de nouveaux traitements contre l'arthrose [69].

L'analyse sur biopuces à ADN démontrait que de nombreux gènes impliqués dans des voies clés de l'inflammation, du catabolisme, de l'anabolisme du cartilage et de l'angiogenèse étaient différemment exprimés entre les conditions IL-1 β et ctrl, COT IL-1 β et IL-1 β , et COT et ctrl.

Concernant la voie de l'inflammation, nous avons confirmé l'effet stimulant de l'IL-1 β sur un grand nombre de cytokines, chimiokines et enzymes, principalement IL-8, IL-6, CXCL6, *tumor necrosis factor alpha induced protein* (TNFAIP)6, *interferon-induced protein 44-like* (IFI44L), CCL20, CXCL1, CCL8, CXCL2, CCL5, CXCL5, CXCL10, CCL2, synthase d'oxyde nitrique (NOS)2A, superoxyde dismutase (SOD)2, synthase de prostaglandine-endoperoxyde (PTGS)2 et PTGES. COT diminuait significativement cet effet stimulant de l'IL-1 β sur l'expression de ces gènes clés de la voie inflammatoire. La chimiokine la plus surexprimée dans la condition IL-1 β était CXCL6. Cette découverte était cohérente avec celles d'études précédentes montrant que l'expression de CXCL6 était augmentée dans les fibroblastes et les chondrocytes humains après stimulation par l'IL-1 β [289, 290]. Il a été montré que CXCL6 était surexprimé dans des synoviocytes dérivés de patients arthrosiques [289]. L'expression de CXCL6 était aussi plus importante dans du cartilage provenant d'une hanche arthrosique que dans du cartilage normal [291]. CXCL6 intervenait dans

l'attraction des neutrophiles et donc dans le processus inflammatoire [292, 293]. C'était également sur ce gène CXCL6 que COT avait son pouvoir inhibiteur le plus fort. Cependant, récemment, il a été montré que CXCL6 était présent dans la matrice territoriale du cartilage sain, lié à des PG [294]. CXCL6 peut représenter une nouvelle cible pour les traitements contre l'arthrose [289, 295]. L'inhibition du gène et de la protéine CXCL6 était un effet majeur de COT et supportait son utilisation dans les états inflammatoires.

La dégradation du cartilage est un mécanisme clé dans l'arthrose. MMP-13 joue principalement un rôle capital dans ce processus. Cette MMP était sur-régulée dans le cartilage arthrosique et était présentée comme la MMP la plus impliquée dans la dégradation du collagène de type II [296-298]. COT inhibait tant l'expression du gène que la production de la protéine MMP-13, stimulées par l'IL-1 β . Ces résultats suggèrent que COT pourrait ralentir la dégradation du cartilage dans l'arthrose via l'inhibition d'MMP-13.

Même si BMP-2 est classiquement impliquée dans la réparation de l'os et du cartilage, nos résultats concordaient avec ceux d'une étude indiquant que l'IL-1 β augmentait l'expression de BMP-2 par les chondrocytes humains [290]. L'expression de BMP-2 était significativement plus grande dans le cartilage arthrosique que dans le cartilage normal. Les patients atteints d'une arthrose sévère du genou avaient des niveaux de BMP-2 dans le sérum et le fluide synovial significativement plus élevés que les patients atteints d'une arthrose modérée [299]. La concentration de BMP-2 dans le sérum et le fluide synovial de patients atteints d'arthrose du genou était corrélée à la sévérité radiographique et symptomatique de l'arthrose [299]. De plus, une augmentation des niveaux de BMP-2 chez la souris provoquait une aggravation sévère de l'ostéophytose [300]. BMP-2 induisait également une augmentation de la vascularisation et la prolifération des fibroblastes [301]. BMP-2 agissait comme un inducteur de l'hypertrophie des chondrocytes [302]. COT diminuait l'effet stimulant de l'IL-1 β sur l'expression du gène et la production de la protéine BMP-2. Ceci peut être interprété comme un effet bénéfique étant donné par ailleurs que la concentration de BMP-2 était corrélée avec la sévérité de la maladie [299].

L'importance de l'angiogenèse dans l'arthrose est maintenant bien connue. Des vaisseaux sanguins ont été observés dans le cartilage arthrosique et une surexpression de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes arthrosiques a été démontrée [190, 303, 304]. Les données générées par l'analyse sur biopuces à ADN montraient que des médiateurs clés de l'angiogenèse étaient modulés par l'IL-1 β et par COT. Plus particulièrement, nous avons observé une surexpression de la STC1 induite par l'IL-1 β et une inhibition de cet effet par COT. Une étude a récemment montré que la STC1 était sur-régulée, tant au niveau génique que protéique, dans les parties enflammées par rapport aux parties normales/réactives d'une membrane synoviale de patient arthrosique [305]. La STC1 joue un rôle dans l'angiogenèse via la voie du VEGF et de son récepteur 2 [189, 306, 307]. Ceci indiquait que COT pouvait protéger le cartilage arthrosique contre l'invasion des vaisseaux sanguins en sous-régulant les médiateurs clés pro-angiogéniques. Finalement, nous avons concentré notre attention sur le gène de la serpine E1. Ce gène était surexprimé dans les conditions COT et COT IL-1 β , respectivement comparé aux conditions ctrl et IL-1 β . La serpine E1 est aussi connue sous le nom d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI)-1. Ce dernier a été décrit comme un membre de la superfamille des inhibiteurs de sérine protéase, qui inhibent l'activateur du plasminogène et l'activateur du plasminogène type urokinase, qui agissent dans la fibrinolyse [308]. PAI-1 régule l'angiogenèse via des effets sur la protéolyse de la matrice extracellulaire et sur l'adhésion cellulaire. PAI-1 inhibe la voie de signalisation VEGF/VEGF récepteur 2 [309]. Étant donné que COT augmentait la synthèse de PAI-1, COT pouvait inhiber la voie du VEGF et, par-là, l'angiogenèse.

L'analyse des biopuces à ADN a révélé que plusieurs gènes étaient sensibles au mélange COT chez les chondrocytes humains. Comme attendu, nous avons confirmé que le mélange COT agissait sur l'inflammation et le métabolisme du cartilage. En outre, de nouvelles informations concernant l'action de COT sur la voie de l'angiogenèse ont été apportées. L'inflammation, le catabolisme, l'anabolisme et l'angiogenèse sont des processus pathophysiologiques importants dans l'arthrose. Les gènes identifiés représentent par conséquent des cibles pour les traitements de l'arthrose.

Évidemment, des essais cliniques sont nécessaires pour démontrer les effets bénéfiques de ces actifs sur les symptômes et les changements structurels associés à l'arthrose. Une préoccupation majeure est l'absence d'information à propos de la biodisponibilité de ces actifs et de leur métabolisation. Cette question est particulièrement applicable pour les polyphénols tels que la curcumine. En effet, la curcumine naturelle est connue pour sa très faible biodisponibilité. Ce point est crucial pour envisager son administration par voie orale. Par exemple, les pics moyens des concentrations sériques après administration orale à des patients de 4, 6 et 8 g de curcumine par jour étaient de $0,51 \pm 0,11$, $0,63 \pm 0,06$ et $1,77 \pm 1,87 \mu\text{M}$, respectivement [310]. La concentration sérique de curcumine atteignait son maximum 1 à 2 h après la prise orale de curcumine et déclinait ensuite graduellement dans les 12 h. L'excrétion urinaire de curcumine était indétectable [310]. Ces concentrations sont inférieures à celles testées dans nos expérimentations ($4 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{M}$). Par conséquent, l'extrapolation de ces résultats *in vitro* à la nutrition humaine doit être faite avec précaution. Cependant, des efforts ont été faits pour augmenter la biodisponibilité de la curcumine. Récemment, une étude pharmacocinétique de phase I sur le Flexofytol, un extrait de curcumine hautement biodisponible (solubilité dans l'eau augmentée de 4000 fois), a été réalisée sur deux groupes de douze individus. Chaque groupe recevait oralement une (42 mg de curcumine) ou deux (84 mg de curcumine) capsules de Flexofytol. Avec deux capsules administrées oralement, la moyenne du C_{max} des douze individus était de $0,9 \mu\text{M}$, avec une extrapolation statistique de $1,6 \mu\text{M}$ avec quatre capsules (168 mg de curcumine) [251]. Le défi est de développer une curcumine avec une biodisponibilité améliorée, avec comme finalité d'atteindre des concentrations sériques qui ont démontré une activité biologique. Dans ce but, la curcumine a été dissoute dans de l'huile, pour être ensuite absorbée en chylomicrons, afin de proposer une curcumine soluble dans l'eau, sans modification de sa structure [251, 311]. La curcumine a aussi été co-administrée avec la piperine, un inhibiteur de la glucuronidation hépatique et intestinale [252], ou incluse dans un complexe phytosome de phosphatidylcholine [312, 313]. La pertinence clinique de ces nouvelles formulations comparées à la curcumine native devrait être démontrée dans un essai clinique.

Finalement, ces résultats *in vitro* indiquaient que la mixture COT pouvait réduire l'inflammation et la douleur dans l'arthrose, en diminuant la synthèse de médiateurs inflammatoires, cataboliques et angiogéniques par les chondrocytes. Ces découvertes fournissent une base pré-clinique pour l'évaluation *in vivo* de ce mélange et suggèrent que ces actifs peuvent être utiles pour soulager les symptômes chez les patients arthrosiques.

4 PARTIE *IN VIVO*

4.1 Introduction

Après avoir démontré que le mélange COT inhibait la synthèse de médiateurs inflammatoires et cataboliques par les chondrocytes, une étude clinique randomisée, contrôlée et en double aveugle a été réalisée pour évaluer l'efficacité du mélange chez des chiens souffrant d'arthrose.

Un signe clinique majeur de l'arthrose chez le chien est la boiterie. Au cours des dernières décennies, la mesure des forces de réaction au sol (FRS), à l'aide d'une plateforme de marche, a été largement utilisée chez les chiens afin de mieux comprendre la locomotion normale, mais surtout les anomalies lors de la présence de pathologies en relation avec une boiterie, telles que l'arthrose [314, 315]. Cette mesure permet d'investiguer la limitation fonctionnelle liée à la douleur chez l'animal arthrosique. À chaque fois qu'un membre entre en contact avec le sol, le corps de l'animal est soumis à des FRS en réponse aux forces musculaires et d'inertie que le membre exerce. En effet, à chaque fois qu'un objet touche le sol, deux forces sont en opposition : la force d'action et la force de réaction. Pour chaque force d'action, il y a une force de réaction égale en intensité, mais opposée en direction. La démarche d'un quadrupède est définie de telle manière que le mouvement peut différer selon la séquence et le rythme des pas et selon le nombre de membres en contact avec le sol à chaque stade d'un cycle de pas. La masse du chien et son centre de gravité provoquent des forces verticales, cranio-caudales et médio-latérales. En réaction, des FRS verticales, cranio-caudales et médio-latérales sont produites (Figure 77).

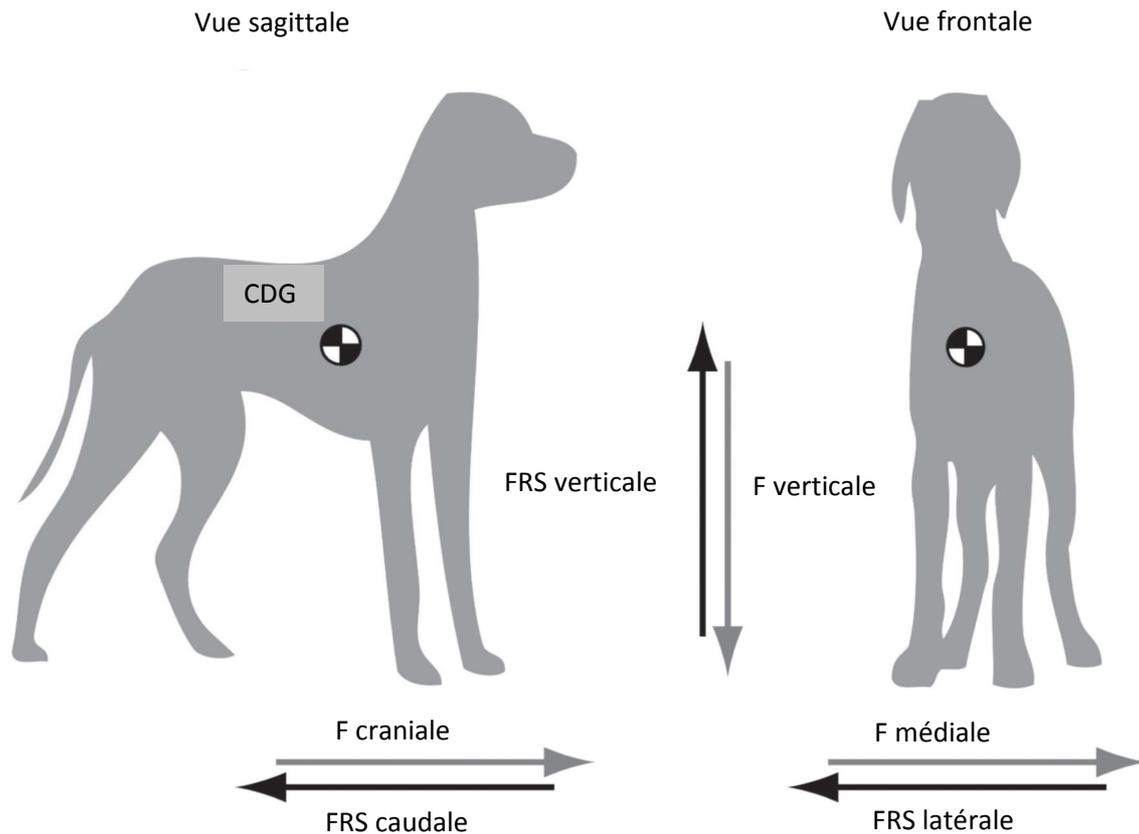


Figure 77. Vues sagittale et frontale d'un chien en position debout. Les trois vecteurs de forces (F) orthogonaux sont pairés avec leur force de réaction au sol (FRS) en direction opposée. La force médiale se réfère au membre droit. CDG= centre de gravité. Image adaptée d'après Moreau et al., 2014 [315].

La figure 78 montre un graphe typique construit à partir des données acquises lorsqu'un chien trotte sur une plateforme de marche. Les deux variables les plus fréquemment utilisées en recherche clinique sont le pic de force verticale (PFV) et l'impulsion verticale (IV). Le PFV correspond au maximum de la courbe représentant les FRS verticales (verte). L'aire sous la courbe représente l'IV. La montée et la descente en charge correspondent respectivement aux pentes positive et négative de la courbe des FRS verticales. Sur la courbe représentant les FRS cranio-caudales (bleue), le pic de force de frein correspond au minimum et le pic de force de propulsion correspond au maximum. L'aire sous la courbe négative représente l'impulsion de frein et l'aire sous la courbe positive représente l'impulsion de propulsion [314].

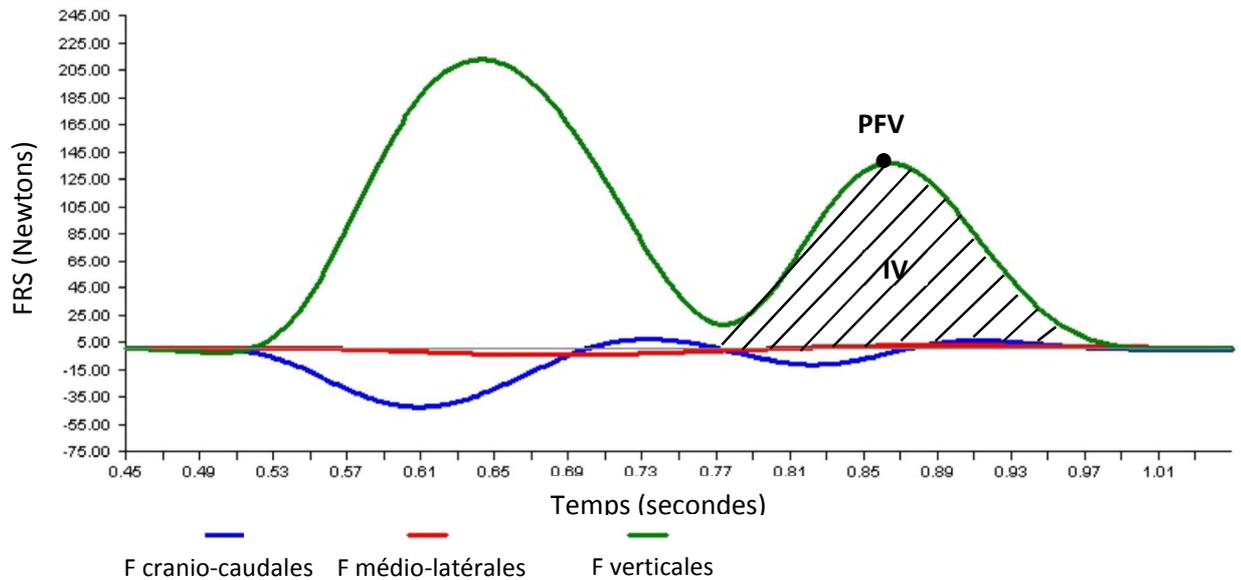


Figure 78. Exemple de graphe construit à partir des données acquises lorsqu'un chien trotte. Ce graphe montre les forces de réaction au sol (FRS) de deux membres (antérieur et postérieur) du même côté d'un chien au trot. La ligne verte représente les données associées aux FRS verticales. Le pic de force verticale (PFV) correspond au maximum de la courbe représentant les FRS verticales (verte). L'aire sous la courbe représente l'impulsion verticale (IV). La ligne bleue représente les données associées aux FRS cranio-caudales. La ligne rouge représente les données associées aux FRS médio-latérales. La première courbe de la ligne verte correspond aux données associées au membre antérieur et la deuxième courbe de la ligne verte correspond aux données associées au membre postérieur. Les valeurs négatives des FRS cranio-caudales (ligne bleue) correspondent aux forces de frein et les valeurs positives correspondent aux forces de propulsion. Image adaptée d'après Gillette et al., 2008 [314].

La plateforme de marche fournit des informations objectives, reproductibles et cliniquement pertinentes sur la capacité fonctionnelle des chiens arthrosiques [316]. Lorsqu'un chien développe naturellement de l'arthrose, une diminution du PFV est observée [315, 316].

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'efficacité, la tolérance et l'innocuité d'un aliment contenant le mélange COT chez des chiens souffrant d'arthrose. Dans ce but, les différents paramètres que nous avons évalués sont : l'analyse des forces sur plateforme de marche, la concentration sérique des biomarqueurs de l'arthrose Coll2-1 et Coll2-1 NO₂ et l'évaluation du chien arthrosique d'une part par le vétérinaire, et d'autre part par le propriétaire.

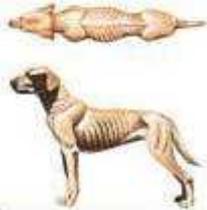
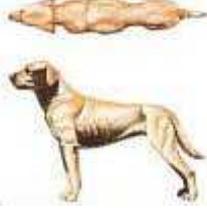
4.2 Population et protocole

4.2.1 Population

Les chiens présentant des signes d'arthrose étaient recrutés parmi les patients de la Clinique Vétérinaire de l'Université de Liège, ou via des annonces par mail au personnel et aux étudiants de l'Université de Liège, dans des magasins pour animaux, chez des vétérinaires, dans des magazines canins, sur des sites web, dans des salons de toilettage ou encore via des associations de petits animaux. Les participants potentiels étaient informés à propos de l'objectif et de la conception de l'étude.

Les critères d'inclusion étaient :

- présenter des signes cliniques et radiologiques d'arthrose sur au moins un membre ;
- être âgé de plus de 18 mois ;
- peser plus de 10 kg et avoir un score de masse corporelle (SMC) inférieur à 8 (sur une échelle de 9) (Figure 79) [317] ;
- ne pas souffrir de maladie systémique.

	SMC	Caractéristiques	Image
Trop mince	1	Côtes, vertèbres lombaires, os pelviens et toutes les proéminences osseuses apparentes. Pas de graisse corporelle perceptible. Perte évidente de masse musculaire	
	2	Côtes, vertèbres lombaires et os pelviens facilement visibles. Pas de graisse palpable. Certains indices d'autres proéminences osseuses. Perte minimale de masse musculaire.	
	3	Côtes facilement palpables et éventuellement visibles, sans graisse palpable. Os pelviens devenant proéminents. Taille et dépression abdominale évidentes.	

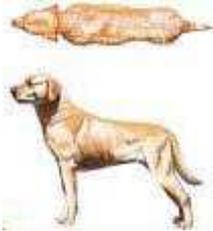
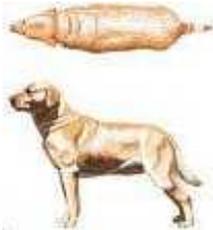
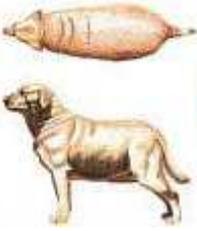
Idéal	4	Côtes facilement palpables, avec une couverture grasseuse minime. Taille facilement identifiée, vue du dessus. Dépression abdominale évidente.	
	5	Côtes palpables sans excès de couverture grasseuse. Taille observée derrière les côtes quand vue du dessus. Abdomen relevé quand vue de côté.	
Trop lourd	6	Côtes palpables avec un léger excès de couverture grasseuse. Taille perceptible vue du dessus, mais non proéminente. Dépression abdominale apparente.	
	7	Côtes difficilement palpables, épaisse couverture grasseuse. Dépôts de graisse visibles aux niveaux de l'aire lombaire et de la base de la queue. Taille absente ou à peine visible. Dépression abdominale peut être présente.	
	8	Côtes non palpables sous une très épaisse couverture grasseuse ou seulement palpable avec une pression importante. Dépôts de graisse abondants aux niveaux de l'aire lombaire et de la base de la queue. Taille absente. Pas de dépression abdominale. Distension abdominale peut être présente.	
	9	Dépôts massifs de graisse aux niveaux du thorax, de la colonne vertébrale et de la base de la queue. Taille et dépression abdominale absentes. Dépôts de graisse dans le cou et aux niveaux des membres. Distension abdominale évidente.	

Figure 79. Système d'évaluation de score de masse corporelle (SMC), développé au centre 'Nestlé Purina Pet Care' [317].

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- présenter des signes d'une maladie lombo-sacrée ou d'un déficit neurologique ;
- présenter des séquelles d'un traumatisme ou d'une inflammation des membres ;
- recevoir un traitement aux AINS, corticostéroïdes ou antibiotiques les quatorze jours précédant le début de l'étude ou durant l'étude ;
- avoir des antécédents chirurgicaux au niveau d'une ou plusieurs articulations dans les six mois précédant le début de l'étude ;
- montrer un comportement agressif ;
- développer une gestation ou gestation probable durant l'étude.

Les critères de sortie de l'étude étaient :

- développer une réaction indésirable au produit ;
- présenter une blessure ou une maladie qui nécessitait un traitement incompatible avec la poursuite de l'étude ;
- nécessiter une intervention chirurgicale ;
- être incapable de continuer l'étude à cause de douleurs excessives ou d'autres complications (décision prise par l'investigateur) ;
- montrer un manque de compliance (propriétaire) avec les restrictions de l'étude ;
- constater le décès du chien, selon une cause naturelle ou selon une décision du propriétaire d'euthanasier l'animal.

4.2.2 Aliments de l'étude

Les deux aliments de l'étude étaient un aliment canin standard (contrôle) et ce même aliment supplémenté du mélange COT (COT). Ces deux produits alimentaires secs canins possédaient le même contenu nutritionnel et énergétique (3515 kcal/kg) (Tableau 17). Les besoins énergétiques des chiens étaient basés sur l'équation publiée par le Conseil National de la Recherche en 2006 : $95 \text{ kcal/kg}^{0.75}$ masse [318, 319]. Les deux aliments ont été fournis par le fabricant dans des conditionnements neutres identiques, mais différenciés par des numéros de code.

L'aliment avec le mélange COT contenait 0,43 g d'extrait de curcuma par 1000 kcal, 0,85 g d'extrait de thé vert par 1000 kcal et 4,27 g de collagène hydrolysé par 1000 kcal. L'extrait de curcuma (Indena, Paris, France) contenait entre 18 et 22 % de curcuminoïdes et était associé à un complexe phosphatidylcholine pour augmenter sa biodisponibilité [320]. L'extrait de thé vert (Naturex, Avignon, France) possédait un contenu total en polyphénols de plus de 25 %, un contenu en catéchines de plus de 12,5 % et un contenu en EGCG de plus de 9,3 %. Les peptides composant le collagène hydrolysé (Gelita, Eberbach, Allemagne) comprenaient 30 acides aminés, ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 3 kDa. La glycine et la proline représentaient plus de 35 % du contenu total en acides aminés.

Tableau 17. Contenu nutritionnel et énergétique des deux aliments de l'étude.

	Unité	Contrôle	COT
Contenu énergétique	kcal/kg	3515	3515
Humidité	%	12,2	12,1
Protéines brutes	%	20,5	20,5
Matière grasse	%	11,7	11,7
Cendres brutes	%	6,0	5,9
Cellulose brute	%	4,0	4,0
Fibres alimentaires	%	9,0	9,0
Extrait non azoté	%	40,2	39,9
Glycine	%	0,7	1,0
Hydroxyproline	%	0,002	0,2
Proline	%	1,1	1,2
Extrait de curcuminoïdes	%	0	0,15
Extrait de thé vert	%	0	0,3
Collagène hydrolysé	%	0	1,5

4.2.3 Conception de l'étude

Il s'agissait d'une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo. Tous les propriétaires recevaient une description écrite détaillée des objectifs et du déroulement de l'étude et fournissaient un consentement éclairé écrit signé avant que leur chien ne soit inclus dans l'étude. Le protocole a été approuvé par la Commission d'Ethique de l'Université de Liège (dossier numéro 12-1330). Les investigateurs collectaient lors de la première visite un échantillon urinaire et un échantillon sanguin pour une analyse sérique du taux de glucose, de l'urée, de la

créatinine, de l'albumine, de l'aspartate amino-transférase et de l'alanine amino-transférase. Les résultats de cette analyse biochimique étaient utilisés pour cribler les chiens éligibles pour l'étude. Les chiens éligibles étaient assignés au hasard dans le groupe contrôle ou dans le groupe COT. Ni les propriétaires des animaux ni les investigateurs ne savaient à quel groupe le chien était assigné. Lors du recrutement pour l'étude, les propriétaires des animaux recevaient l'instruction d'habituer leurs chiens à une nourriture de transition (équivalente à l'aliment contrôle en terme de formulation, mais différente en terme de taille et de forme) pendant 14 jours. De cette manière, les chiens éligibles recevaient le même aliment (ne contenant aucun complément alimentaire) avant le début de l'étude. La ration quotidienne était précisée au propriétaire afin de maintenir le poids du chien constant. Les chiens étaient pesés chaque mois. L'alimentation standard avec ou sans le mélange COT était administrée durant 3 mois (Figure 80).

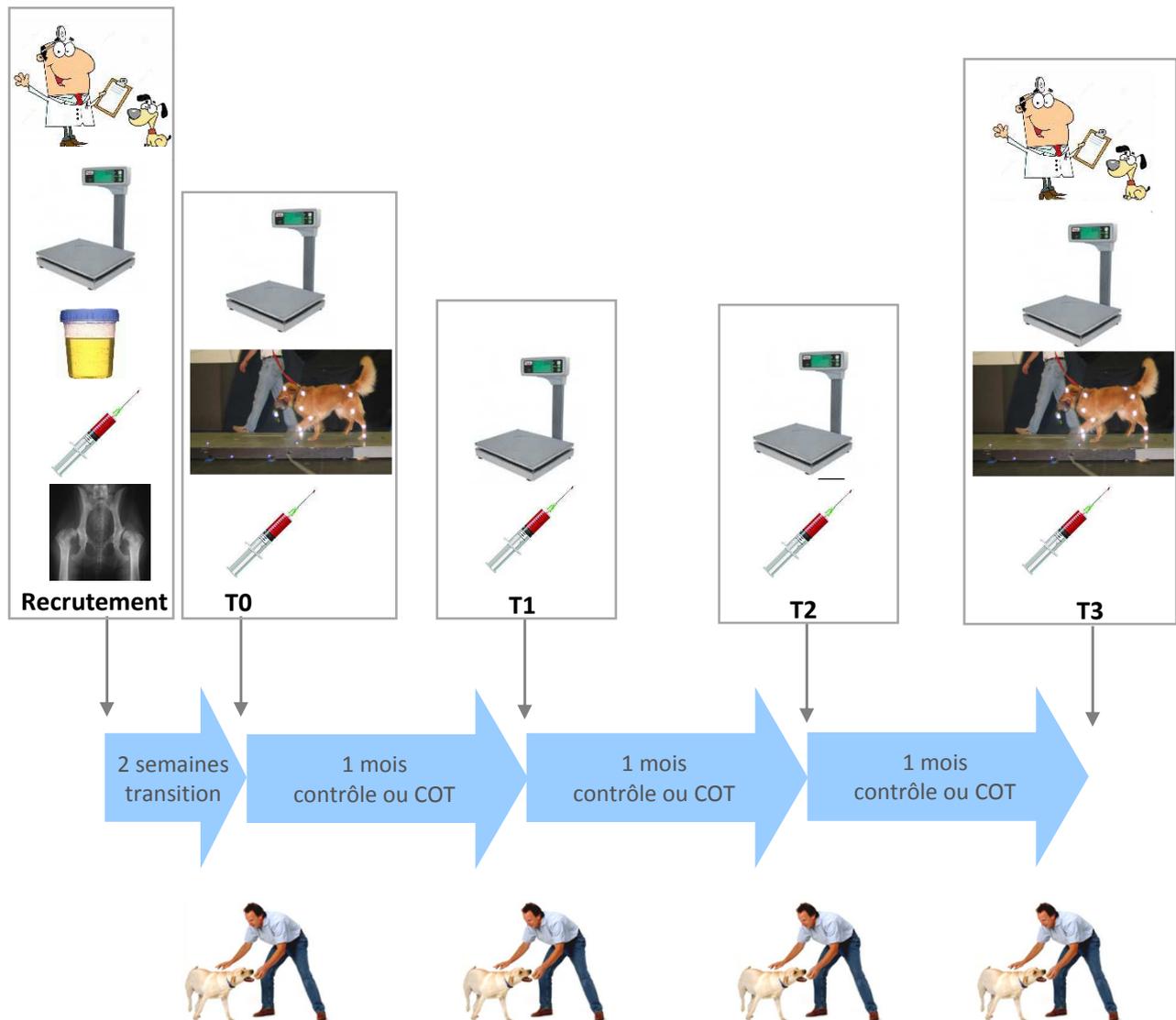


Figure 80. Protocole de l'étude clinique randomisée, en double aveugle et avec un contrôle-placebo. Deux semaines avant le début de l'étude, un examen clinique général et orthopédique, une pesée, une analyse urinaire, une analyse sanguine et une radiographie étaient réalisés. Au début de l'étude (T0), une pesée, une analyse sur la plateforme de marche, un prélèvement sanguin et un questionnaire du propriétaire étaient réalisés. Un mois après le début de l'étude (T1), une pesée, un prélèvement sanguin et un questionnaire du propriétaire étaient réalisés. Deux mois après le début de l'étude (T2), une pesée, un prélèvement sanguin et un questionnaire du propriétaire étaient réalisés. À la fin de l'étude (T3), un examen clinique orthopédique, une pesée, une analyse sur la plateforme de marche, un prélèvement sanguin et un questionnaire du propriétaire étaient réalisés.

4.2.4 Effets indésirables

Durant toute la durée de l'étude, tous les effets indésirables étaient rapportés aux investigateurs, qui notaient la nature et la sévérité de l'évènement, si l'évènement était nouveau, toute association potentielle avec l'alimentation de l'étude, et d'autres détails pertinents à la compréhension de l'effet indésirable.

4.2.5 Plateforme de marche

Lors de la visite d'inclusion, le membre le plus atteint était déterminé grâce à un examen orthopédique et confirmé au début de l'étude (T0 = inclusion + 14 jours d'aliment de transition) par la valeur du PFV obtenue sur la plateforme de marche. En effet, les chiens étaient évalués en utilisant les plateformes de force biomécaniques (Kistler, Winterthur, Suisse) du Laboratoire d'Analyse du Mouvement Humain de l'Université de Liège. Les FRS étaient enregistrées à T0 et après trois mois d'alimentation contrôle ou COT (T3) (Figure 80). La plateforme de marche était calibrée avant chaque évaluation. Les propriétaires faisaient trotter leur chien sur la plateforme de marche. Un investigateur observait et filmait chaque passage afin de confirmer les poses de pattes et la démarche. Un passage était considéré comme valide lorsque, à un moment précis, un seul membre était posé sur la plateforme de marche, que la vitesse de trot était comprise entre 1,8 et 2,2 m/s et qu'une accélération-décélération de $\pm 0,5 \text{ m/s}^2$ était enregistrée. La vitesse était mesurée avec un minuteur et un capteur (Charnwood Dynamics, Rothley, Royaume-Uni) placé sur le dos du chien. Cinq passages valides étaient obtenus pour le membre arthrosique et le membre controlatéral.

Le PFV, l'IV, la montée en charge, la descente en charge (forces verticales), les pics de force de frein, les pics de force de propulsion, l'impulsion de frein et l'impulsion de propulsion (forces cranio-caudales) étaient mesurés et enregistrés grâce au logiciel CODAmotion (V6.78.1) (Charnwood Dynamics). Toutes les forces étaient normalisées par rapport au poids (Newton) et exprimées en % du poids. La moyenne des données provenant des cinq passages validés pour chaque membre était calculée pour obtenir une valeur moyenne pour chaque force ou impulsion à chaque temps de l'étude.

4.2.6 Biomarqueurs de l'arthrose

Des échantillons sanguins étaient collectés chaque mois (T0, après 1 mois d'alimentation contrôle ou COT (T1), après 2 mois d'alimentation contrôle ou COT (T2) et à T3) pour mesurer les concentrations sériques des biomarqueurs de

l'arthrose (Coll2-1 et Coll2-1 NO₂) (Figure 80) en utilisant deux dosages immunologiques spécifiques compétitifs (Artialis, Liège, Belgique) [321].

Ces dosages sont des dosages immunologiques spécifiques compétitifs utilisant un peptide synthétique fixé sur le fond des puits de la plaque 96 puits, pour la quantification de l'antigène correspondant dans les échantillons. Lors de l'addition de l'anticorps primaire, une compétition pour la liaison à l'anticorps s'installe entre le peptide synthétique immobilisé et le peptide contenu dans les échantillons. Après élimination des peptides non liés, un anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase était ajouté dans chaque puits pour détecter et quantifier le niveau de compétition. Après lavage de cet anticorps de détection non lié, le complexe anticorps-antigène était détecté par une réaction chromogène via l'ajout de TMB. La réaction était arrêtée par l'ajout d'une solution acide. L'absorbance était mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. La composition des tampons utilisés pour les dosages est confidentielle. Les échantillons étaient respectivement dilués six et deux fois pour les dosages Coll2-1 et Coll2-1 NO₂.

4.2.7 Évaluation par le vétérinaire

À T0 et à T3, un examen orthopédique était réalisé par le vétérinaire et les chiens étaient scorés pour la boiterie (1 à 5), la douleur à la manipulation (0 à 10), la douleur à la palpation (1 à 5) et la limitation à la mobilité de l'articulation (1 à 5) (Figure 80). Les grilles d'évaluation pour la boiterie, la douleur à la palpation et la limitation à la mobilité de l'articulation sont décrites dans le Tableau 18 [322]. La douleur à la manipulation était évaluée sur une échelle de 0 à 10, 0 correspondant à 'aucune douleur' et 10 correspondant à 'douleur extrême'.

Tableau 18. Système de scores cliniques de l'arthrose chez le chien [322].

Boiterie	1	marche normalement
	2	légèrement boiteux lors de la marche
	3	modérément boiteux lors de la marche
	4	sévèrement boiteux lors de la marche
	5	réticent à se lever et ne marche pas plus de 5 pas ou ne pose pas du tout la patte au sol
Douleur à la palpation de l'articulation	1	aucune
	2	signes bénins, le chien tourne la tête en reconnaissance
	3	signes modérés, le chien retire son membre
	4	signes sévères, le chien aboie ou devient agressif
	5	le chien ne permet pas la palpation
Mobilité de l'articulation	1	aucune limitation de mouvement
	2	limitation légère (10-20 %) des mouvements, pas de crépitement
	3	limitation légère (10-20 %) des mouvements, crépitement
	4	limitation modérée (20-50 %) des mouvements, ± crépitement
	5	limitation sévère (>50 %) des mouvements, ± crépitement

4.2.8 Évaluation par le propriétaire

Les propriétaires évaluaient l'état de leur chien à chaque visite mensuelle (T0, T1, T2 et T3) en complétant un questionnaire validé, nommé '*Canine Brief Pain Inventory*' (CBPI), évaluant la sévérité de la douleur (SD) et l'interférence de la douleur (ID) sur les activités de la vie quotidienne (Figure 80) [323]. Les quatre questions pour estimer SD (douleur la plus intense ressentie par le chien ces 7 derniers jours, douleur la moins intense ressentie par le chien ces 7 derniers jours, douleur moyenne ressentie par le chien ces 7 derniers jours, douleur ressentie par le chien en ce moment) étaient évaluées sur une échelle de 0 à 10, 0 correspondant à 'aucune douleur' et 10 correspondant à 'douleur extrême'. La moyenne des réponses

à ces questions était calculée pour générer le score SD. Les six questions permettant d'estimer ID (influence de la douleur sur l'activité générale du chien ces 7 derniers jours, influence de la douleur sur le plaisir de vivre du chien ces 7 derniers jours, influence de la douleur sur la capacité du chien à passer de la position allongée à la position debout ces 7 derniers jours, influence de la douleur sur la capacité du chien à marcher ces 7 derniers jours, influence de la douleur sur la capacité du chien à courir ces 7 derniers jours, influence de la douleur sur la capacité du chien à monter des escaliers ou des bordures ces 7 derniers jours) étaient évaluées sur une échelle de 0 à 10, 0 correspondant à 'aucune influence' et 10 correspondant à 'influence extrême'. La moyenne des réponses à ces questions était réalisée pour générer le score ID.

4.2.9 Analyses statistiques

La taille de l'échantillon a été calculée en se basant sur une étude antérieure évaluant l'effet d'un extrait de curcuma chez les chiens arthrosiques [224]. En considérant une puissance statistique de 80 % et en autorisant un niveau d'incertitude alpha de 5 %, un test bilatéral pour la comparaison de deux moyennes était réalisé. Ce test prédisait un nombre nécessaire total d'échantillons de quarante-deux. Étant donné qu'il y a généralement 10 à 20 % de sujets sortant de l'étude, nous avons décidé de recruter un nombre de quarante-six à cinquante chiens.

Selon les données de sortie, des modèles linéaires généralisés ou des modèles mixtes étaient utilisés et analysés grâce à SAS 9.3. L'effet temps, l'effet aliment et leur interaction étaient analysés à T0 et à T3. L'effet aliment était également investigué sur le delta T3-T0. Selon les caractéristiques des données, leur distribution normale ou non, et la distribution de résidus pour chaque modèle, les résultats étaient précédemment transformés en rang ou non. Les données étaient exprimées avec la moyenne \pm SEM. Une p-valeur $\leq 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

4.3 Résultats

4.3.1 Chiens

Cent cinquante-cinq propriétaires de chiens ont répondu aux annonces. Après un entretien téléphonique d'informations, cent quinze propriétaires ont été invités avec leur chien à la première visite de sélection. Parmi ces cent quinze chiens, quarante-huit ont été considérés éligibles pour l'étude et ont été assignés de manière aléatoire à recevoir l'aliment COT (n=23) ou l'aliment contrôle (n=25) pendant trois mois. Deux chiens dans le groupe COT et quatre chiens dans le groupe contrôle ont été exclus de l'étude pour les raisons suivantes : développement d'une maladie qui nécessitait un traitement incompatible avec la poursuite de l'étude ou une intervention chirurgicale (trois chiens du groupe contrôle), décision par l'investigateur que le chien ne pouvait pas poursuivre l'étude à cause de l'apparition d'un déficit neurologique (un chien du groupe contrôle), manque de compliance du propriétaire avec les restrictions de l'étude (un chien du groupe COT) et décision par le propriétaire d'euthanasier le chien (un chien du groupe COT). Par conséquent, quarante-deux chiens ont terminé l'étude, incluant vingt-et-un chiens du groupe COT et vingt-et-un chiens du groupe contrôle. Seules les données des chiens qui ont terminé l'étude étaient incluses dans l'analyse.

Les caractéristiques des chiens qui ont complété l'étude sont résumées dans le Tableau 19. À l'inclusion et à T3, il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes pour la masse et l'âge. Parmi les chiens qui ont terminé l'étude dans le groupe contrôle, les races suivantes étaient représentées : chien de rue (n=6), Berger allemand (n=5), Bouvier bernois (n=2), Border Collie (n=2), Berger australien (n=1), Dogue de Bordeaux (n=1), Braque d'Auvergne (n=1), Braque allemand (n=1), Golden Retriever (n=1) et Rottweiler (n=1). Les races suivantes étaient représentées dans le groupe COT : Golden Retriever (n=5), Border Collie (n=2), Cocker (n=2), Berger allemand (n=2), Labrador (n=2), Terre-Neuve (n=2), Airedale Terrier (n=1), Bouvier bernois (n=1), Dogue allemand (n=1), chien de rue (n=1), Pitbull (n=1) et Saint-Bernard (n=1).

Tableau 19. Caractéristiques des chiens qui ont terminé l'étude. Les données sont exprimées en distribution (nombre de chiens) pour les caractéristiques catégorielles et en moyenne \pm SEM pour les caractéristiques quantitatives continues.

Caractéristiques	Aliment contrôle	Aliment COT	p-valeur
Nombre total de sujets	21	21	NA
Mâle/femelle	8/13	10/11	NA
Mâle castré/femelle stérilisée/intact	2/9/10	6/7/8	NA
Âge à T0 (années)	7,50 \pm 0,62	7,56 \pm 0,67	0,952
Masse à T0 (kg)	34,91 \pm 7,62	36,43 \pm 7,95	0,563
Masse à T3 (kg)	35,17 \pm 7,68	36,13 \pm 7,88	0,717
Articulation principalement touchée			
Carpe	1	0	NA
Coude	5	2	NA
Genou	2	6	NA
Hanche	13	13	NA

T0=début de l'étude ; T3=fin de l'étude ; NA=non applicable

4.3.2 Tolérance et innocuité

Le traitement était bien toléré. Il n'y avait ni de changement significatif dans le poids des chiens ni d'effet indésirable significatif durant l'étude.

4.3.3 Plateforme de marche

Les résultats de PFV (pour le membre le plus sévèrement atteint) à T0 et à T3 pour le groupe contrôle et pour le groupe COT sont représentés dans le Tableau 20. PFV était exprimé en % du poids \pm SEM. Les valeurs n'étaient pas significativement différentes entre le groupe contrôle et le groupe COT à T0 ($p=0,618$) et à T3 ($p=0,953$). Il n'y avait pas de changement significatif de la variable PFV entre T0 et T3 et ce, quelle que soit l'alimentation reçue (groupe contrôle ($p=0,999$); groupe COT ($p=0,283$)). Le changement de PFV ($\Delta T3-T0$) n'était pas différent entre les groupes ($p=0,319$) (Figure 81). Le mélange COT ne modifiait pas l'IV, la montée en charge, la descente en charge, les pics de force de frein, les pics de force de propulsion, l'impulsion de frein et l'impulsion de propulsion.

Tableau 20. Moyenne \pm SEM pour le membre le plus sévèrement atteint pour le pic de force verticale (PFV) de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=21) ou un aliment COT (n=21).

	T0 valeur	T3 valeur	p-valeur temps	p-valeur ΔT3-T0
PFV (% poids)				
contrôle	69,65 \pm 4,33	69,63 \pm 3,18	0,999	0,319
COT	61,81 \pm 2,52	67,44 \pm 3,32	0,283	

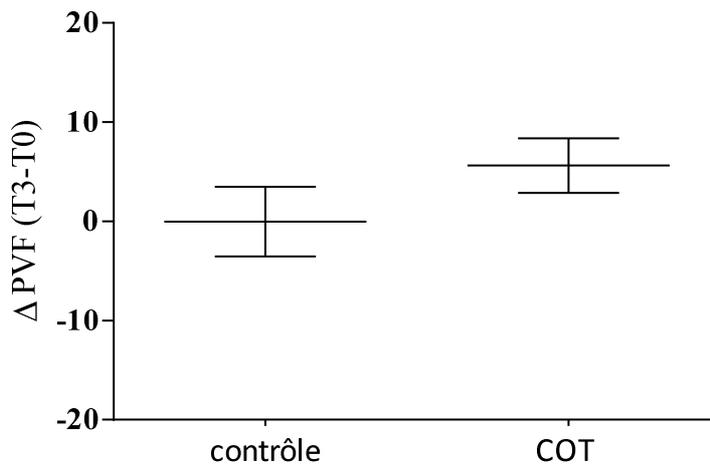


Figure 81. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 du pic de force verticale (PFV) dans la population totale pour les groupes contrôle et COT.

Dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes (60^e percentile : 8,7 ans, âge moyen : 5,8 \pm 0,4 ans, n=15 chiens du groupe contrôle + 11 chiens du groupe COT), l'augmentation du PFV (Δ T3-T0) était significativement plus importante dans le groupe COT que dans le groupe contrôle (p=0,049) (Tableau 21) (Figure 82). En effet, le PFV augmentait de 15 % entre T0 et T3 dans le groupe COT alors qu'il n'augmentait que de 4 % dans le groupe contrôle.

Tableau 21. Moyenne \pm SEM pour le membre le plus sévèrement atteint pour le pic de force verticale (PFV) de 26 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=15) ou un aliment COT (n=11).

	T0 valeur	T3 valeur	p-valeur temps	p-valeur ΔT3-T0
PFV (% poids)				
contrôle	66,49 \pm 3,97	69,22 \pm 3,72	0,999	0,049
COT	61,12 \pm 3,8	70,11 \pm 6,06	0,259	

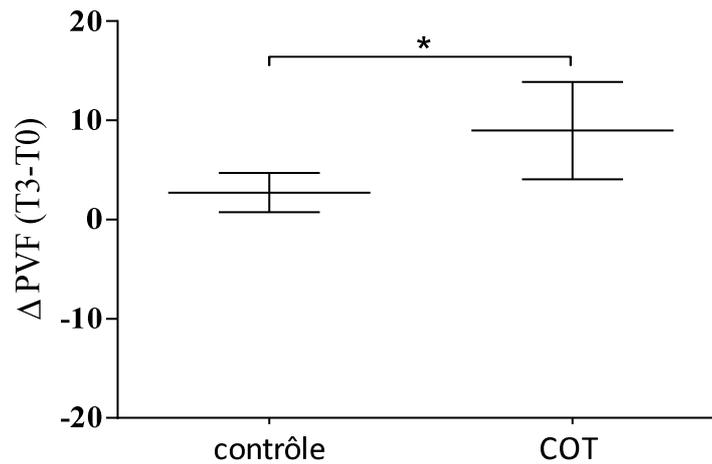


Figure 82. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 du pic de force verticale (PFV) dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes pour les groupes contrôle et COT. * $p < 0,05$

4.3.4 Biomarqueurs de l'arthrose

Les taux sériques de Coll2-1 et Coll2-1NO₂ n'étaient pas significativement modifiés après trois mois de traitement, quelle que soit l'alimentation reçue, ni pour la population totale ni pour le sous-groupe des chiens les plus jeunes. Par ailleurs, les taux sériques de Coll2-1 et Coll2-1NO₂ n'étaient pas différents entre les groupes contrôle et COT (Tableau 22).

Tableau 22. Moyenne \pm SEM pour les concentrations sériques des biomarqueurs Coll2-1 et Coll2-1NO₂ de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle (n=21) ou un aliment COT (n=21).

	T0 valeur	T1 valeur	T2 valeur	T3 valeur	p-valeur temps* aliment
Coll2-1 (nM)					
contrôle	1410,42 \pm 148,57	1443,08 \pm 114,28	1395,2 \pm 96,52	1359,28 \pm 73,52	0,705
COT	1606,11 \pm 154,01	1752,4 \pm 150,46	1744,63 \pm 126,68	1722,94 \pm 188,15	
Coll2-1 NO₂ (nM)					
contrôle	1,26 \pm 0,06	1,29 \pm 0,08	1,20 \pm 0,04	1,37 \pm 0,11	0,368
COT	1,86 \pm 0,2	1,81 \pm 0,19	1,75 \pm 0,21	1,78 \pm 0,19	

4.3.5 Évaluation par le vétérinaire

Le mélange COT diminuait de façon significative la douleur à la manipulation de l'articulation dans le groupe COT ($p = 0,037$), alors que l'alimentation contrôle

n'avait pas d'effet ($p=0,999$). Après trois mois de traitement, la douleur à la manipulation était significativement plus faible dans le groupe COT que dans le groupe contrôle ($p=0,036$) (Tableau 23) (Figure 83).

Tableau 23. Moyenne \pm SEM pour la boiterie et pour le membre le plus sévèrement atteint pour la douleur à la palpation de l'articulation, la limitation à la mobilité de l'articulation et la douleur à la manipulation de l'articulation de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle ($n=21$) ou un aliment COT ($n=21$).

	T0 valeur	T3 valeur	p-valeur temps*aliment
Boiterie			
contrôle	1,8 \pm 0,17	1,95 \pm 0,23	0,244
COT	2,19 \pm 0,19	1,86 \pm 0,21	
Douleur à la palpation			
contrôle	2,45 \pm 0,21	2,55 \pm 0,21	0,195
COT	2,62 \pm 0,2	2,1 \pm 0,21	
Limitation à la mobilité			
contrôle	2,3 \pm 0,24	2,75 \pm 0,28	0,815
COT	2,71 \pm 0,31	2,7 \pm 0,27	
Douleur à la manipulation			
contrôle	4,19 \pm 0,52	2,86 \pm 0,51	0,036
COT	3,65 \pm 0,56	3,7 \pm 0,4	

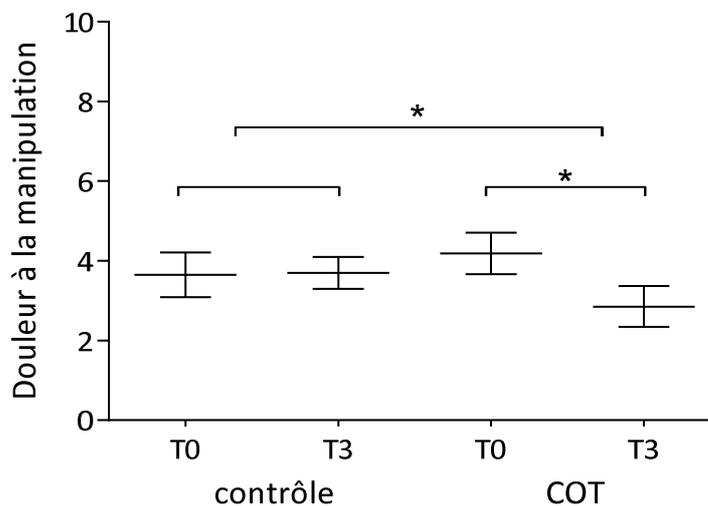


Figure 83. Moyenne \pm SEM pour la douleur à la manipulation de l'articulation dans la population totale pour les groupes contrôle et COT à T0 et à T3. * $p<0,05$

Pour le sous-groupe des chiens les plus jeunes, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes contrôle et COT ou entre T0 et T3 pour la boiterie, la

douleur à la palpation de l'articulation, la limitation à la mobilité de l'articulation et la douleur à la manipulation de l'articulation.

4.3.6 Évaluation par le propriétaire

Le Δ T3-T0 pour la SD était significativement différent entre les groupes contrôle et COT ($p=0,009$) (Figure 84). La SD augmentait dans le groupe contrôle alors que ce paramètre était stable dans le groupe COT. L'ID n'était pas influencée par le traitement ($p=0,063$) (Tableau 24). Cependant, lorsque les six questions correspondant au paramètre ID étaient analysées séparément, la capacité du chien à passer de la position allongée à la position debout était significativement améliorée par le mélange COT par rapport au contrôle ($p=0,029$) (Figure 85).

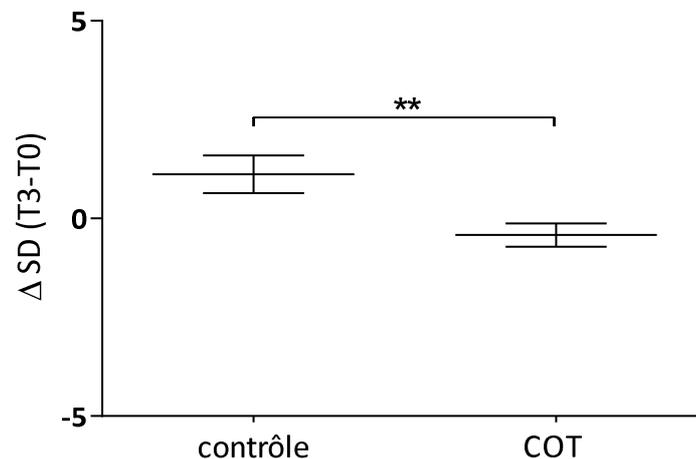


Figure 84. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 de la sévérité de la douleur (SD) dans la population totale pour les groupes contrôle et COT. ** $p<0,01$

Tableau 24. Moyenne \pm SEM pour la sévérité de la douleur (SD) et l'interférence de la douleur (ID) de 42 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle ($n=21$) ou un aliment COT ($n=21$).

	T0 valeur	T3 valeur	p-valeur temps	p-valeur Δ T3-T0
SD				
contrôle	2,46 \pm 0,45	3,58 \pm 0,51	0,071	0,009
COT	2,67 \pm 0,19	2,42 \pm 0,21	0,35	
ID				
contrôle	3,44 \pm 0,59	3,86 \pm 0,66	0,633	0,133
COT	3,26 \pm 0,54	2,96 \pm 0,45	0,104	

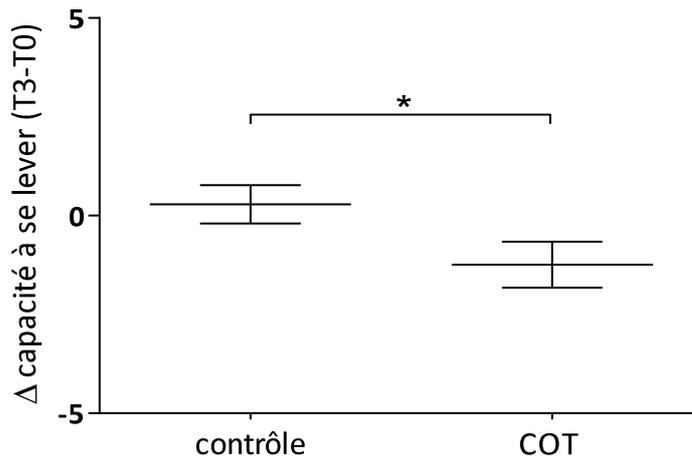


Figure 85. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 de la capacité à passer de la position allongée à la position debout dans la population totale pour les groupes contrôle et COT. * $p < 0,05$

Dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes, SD augmentait significativement dans le groupe contrôle ($p = 0,007$), mais diminuait légèrement dans le groupe COT. Le Δ T3-T0 pour la SD était significativement différent entre les groupes contrôle et COT ($p < 0,001$) (Tableau 25) (Figure 86).

Tableau 25. Moyenne \pm SEM pour la sévérité de la douleur (SD) et l'interférence de la douleur (ID) de 26 chiens arthrosiques assignés de manière aléatoire pour recevoir un aliment contrôle ($n = 15$) ou un aliment COT ($n = 11$).

	T0 valeur	T3 valeur	p-valeur temps	p-valeur Δ T3-T0
SD				
contrôle	2,4 \pm 0,52	3,7 \pm 0,59	0,007	<0,001
COT	1,82 \pm 0,41	1,25 \pm 0,43	0,463	
ID				
contrôle	3,4 \pm 0,74	3,98 \pm 0,74	0,357	0,07
COT	2,33 \pm 0,65	2 \pm 0,54	0,839	

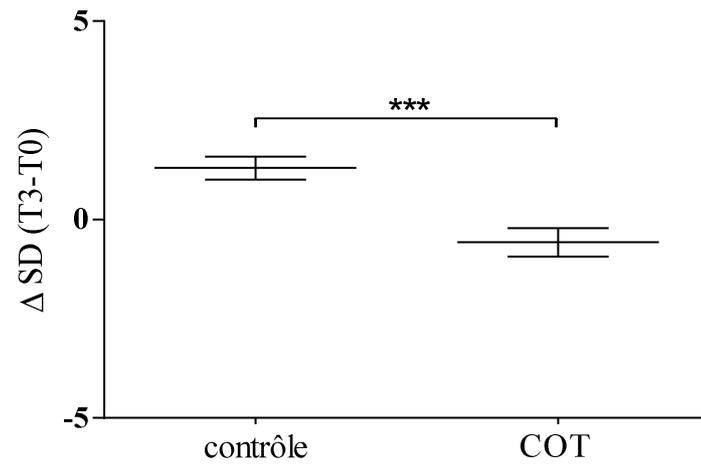


Figure 86. Moyenne \pm SEM pour le Δ T3-T0 de la sévérité de la douleur (SD) dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes pour les groupes contrôle et COT. *** $p < 0,001$

4.4 Discussion

Notre étude clinique montrait que le mélange COT améliorait le statut algo-fonctionnel des chiens arthrosiques. En effet, nous avons observé que COT diminuait la douleur à la manipulation et améliorait la SD ainsi que la capacité à se relever des chiens.

Par contre, nous n'avons pas observé d'amélioration du PFV évaluée à l'aide d'une plateforme de force. D'autres études ont montré un effet bénéfique d'une alimentation enrichie en acides gras omega-3 [225, 228], en hydrolysats de collagène de type II [215] ou en GLM sur ce paramètre [232], alors qu'un extrait de curcuma n'avait pas d'effet [224]. L'ensemble de ces études démontraient que le PFV est un paramètre sensible à certains compléments. Nous nous sommes donc demandés pourquoi notre mélange n'améliorait pas le PFV alors qu'il était efficace sur certains paramètres cliniques. Il a notamment déjà été démontré que le questionnaire CBPI n'était pas corrélé avec les changements observés du PFV [324].

Dans la population de chiens que nous avons étudiée, il y avait une hétérogénéité dans la sévérité et la localisation de l'arthrose. Par exemple, certains chiens souffraient d'arthrose sévère au niveau de la hanche alors que d'autres souffraient d'arthrose plus modérée au niveau du genou. Il a été démontré que la variation de PFV était différente selon l'articulation touchée par l'arthrose. En effet, les chiens affectés par de l'arthrose au niveau du genou ont une diminution plus importante du PFV que les chiens atteints d'arthrose au niveau de la hanche [325]. Dans notre étude, seulement 19 % des chiens souffraient d'arthrose du genou. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence d'effet de COT sur ce paramètre était liée à la proportion importante de chiens souffrant d'arthrose de la hanche (62 %) dans notre population. Néanmoins, cette population hétérogène mimait les situations cliniques réelles en médecine vétérinaire. Cette hétérogénéité peut être considérée comme une force de notre étude. De plus, à l'heure où les procédures éthiques sont de plus en plus mises en évidence et où la recherche sur la douleur est en pleine émergence, il était plus probant et cliniquement pertinent d'utiliser des chiens de propriétaires qui souffraient réellement de cette maladie chronique et qui menaient une vie classique, plutôt que des chiens de laboratoire auxquels on aurait

chirurgicalement induit l'arthrose. De façon intéressante, nous avons observé que chez les chiens les plus jeunes (60^e percentile : 8,7 ans, âge moyen : $5,8 \pm 0,4$ ans, n=15 chiens du groupe contrôle + 11 chiens du groupe COT), COT augmentait significativement le PFV par rapport au groupe contrôle. L'effet observé chez les chiens les plus jeunes pourrait être dû à une meilleure biodisponibilité des agents naturels contenus dans COT. En effet, chez l'humain, une diminution de l'absorption intestinale de certaines substances est observée avec le vieillissement [326]. Une autre explication est que les chiens les plus jeunes présentaient des stades d'arthrose moins avancés et pouvaient donc être plus sensibles à l'aliment COT.

Pour la première fois, nous avons mesuré les concentrations sériques des biomarqueurs de l'arthrose pour évaluer chez des chiens arthrosiques les effets d'un aliment enrichi avec la mixture COT sur le métabolisme du cartilage. Les concentrations de Coll2-1 et Coll2-1 NO₂ étaient corrélées avec la sévérité des lésions macroscopiques et histologiques du cartilage chez les chiens développant une arthrose après une section du ligament croisé antérieur [327]. L'identification, la validation et la qualification de nouveaux biomarqueurs reste nécessaire [328]. Dans notre étude, COT ne modifiait pas significativement les taux sériques de Coll2-1 et Coll2-1 NO₂. Ces résultats étaient inattendus car, chez des patients humains souffrant de gonarthrose, la curcumine réduisait les taux sériques de Coll2-1 [329]. Nous pouvons avancer deux hypothèses pour expliquer cette absence d'effet de COT: 1. La biodisponibilité de la curcumine utilisée dans notre mélange qui serait plus faible ; 2. Une métabolisation différente de la curcumine chez le chien et chez l'homme. En effet, une limitation majeure de notre étude est l'absence d'informations à propos de la biodisponibilité des actifs du mélange COT et de leur métabolisation. Cette question est particulièrement applicable pour les polyphénols tels que la curcumine. La curcumine naturelle est connue pour sa très faible biodisponibilité. Le défi est de développer une curcumine avec une biodisponibilité améliorée, avec comme finalité d'atteindre des concentrations sériques qui ont démontré une activité biologique. Dans ce but, la curcumine a été dissoute dans de l'huile, pour être ensuite absorbée en chylomicrons, afin de proposer une curcumine soluble dans l'eau, sans modification de sa structure [251, 311]. La curcumine a aussi été co-administrée avec

la piperine, un inhibiteur de la glucuronidation hépatique et intestinale [252] ou incluse dans un complexe phytosome de phosphatidylcholine [312, 313]. La pertinence clinique de ces nouvelles formulations comparées à la curcumine native devrait être démontrée dans des essais cliniques chez le chien. Une infusion de curcumine liposomale (10 mg/kg) pendant 2 ou 8 h à des Beagles a montré que les niveaux sériques du métabolite de la curcumine, la tétrahydrocurcumine, étaient 6,3 à 9,6 fois plus élevés que les taux sériques de curcumine native. Ceci suggérait un métabolisme rapide de la curcumine associé à une élimination (hépatique et rénale) lente de la tétrahydrocurcumine [254]. L'analyse de la distribution tissulaire de la curcumine chez les chiens révélait que les quantités les plus élevées de curcumine se trouvaient dans les poumons et dans le foie. Le pancréas, les reins et la vessie contenaient également des doses relativement élevées de curcumine. Cette étude mentionnait la présence de curcumine au niveau des muscles, mais pas au niveau du cartilage [330]. Malgré ces efforts, les données concernant la biodisponibilité et la métabolisation des actifs nutritionnels chez le chien manquent. Il serait intéressant de mesurer les concentrations sériques des différents actifs nutritionnels et de leurs métabolites tout au long de l'étude. Dans ce contexte, il est envisageable de concevoir que de plus grandes doses de la mixture COT, ou une mixture COT bio-optimisée, auraient pu contribuer à montrer des améliorations perceptibles du PFV et des taux sériques des biomarqueurs.

La douleur lors de la manipulation de l'articulation était diminuée dans le groupe COT, entre T0 et T3, mais pas dans le groupe contrôle. Il y avait une différence statistiquement significative entre les groupes COT et contrôle pour la douleur à la manipulation de l'articulation. Cette observation était cohérente avec celle d'une étude évaluant l'effet du collagène de type II non dénaturé qui démontrait aussi une diminution de la douleur lors de la manipulation de l'articulation [219]. L'amélioration de la douleur n'était pas associée avec l'amélioration de la boiterie. Ceci peut être expliqué par le fait que la manipulation évalue la douleur provenant des tissus péri-articulaires alors que la boiterie est générée par la douleur causée par des stimuli mécaniques appliqués sur des tissus pathologiques.

Les évaluations par les propriétaires sont des mesures subjectives, mais lorsque des mesures subjectives sont employées, un score composite est plus efficace que des scores individuels [228]. Dans notre étude, nous avons utilisé le questionnaire CBPI validé qui propose deux scores composites : SD et ID [323]. L'évolution de la SD, évaluée par le delta T3-T0, était significativement différente entre les groupes COT et contrôle, le groupe COT tendant à s'améliorer et le groupe contrôle tendant à s'aggraver. Cependant, il n'y avait pas de différence statistiquement significative pour l'ID entre les groupes COT et contrôle. Néanmoins, lorsque les six questions correspondant au paramètre ID étaient analysées séparément, l'évolution de la capacité du chien à passer de la position allongée à la position debout, évaluée par le delta T3-T0, était significativement meilleure pour le groupe COT, par rapport au groupe contrôle. Ces résultats sont en adéquation avec ceux d'une étude évaluant les effets de l'huile de poisson contenant de hautes concentrations d'acides gras oméga-3 chez des chiens arthrosiques. L'administration d'huile de poisson s'accompagnait d'une amélioration significative de la capacité des chiens à se lever d'une position de repos, à jouer ou à marcher. L'amélioration de la douleur n'était pas associée à l'amélioration de la boiterie. Il a en effet été démontré que le questionnaire CBPI n'était pas corrélé avec les changements observés dans les données acquises par la plateforme de marche [324].

En conclusion, les résultats de notre étude supportent l'hypothèse que les chiens qui recevaient un aliment enrichi avec le mélange COT exprimaient moins de douleur après trois mois. La différence d'évolution entre les groupes suggère qu'un traitement plus long pourrait être nécessaire pour atteindre un effet significatif sur d'autres paramètres. L'amélioration de la boiterie était plus importante dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes. Ces résultats supportent l'utilisation du mélange COT dans la prise en charge de l'arthrose. Outre son utilité dans la prise en charge des symptômes, ce mélange pourrait être utile pour diminuer la consommation d'AINS ou d'analgésiques chez des chiens arthrosiques avec comorbidités. En effet, COT n'induisait pas d'effet indésirable significatif et le traitement était bien toléré. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer les effets à long terme de COT sur les changements structurels, confirmer

les résultats sur un échantillon plus grand, apporter de nouvelles données concernant la biodisponibilité et approfondir l'effet de facteurs confondants tels que la sévérité d'atteinte de l'arthrose, l'âge ou encore la localisation et le nombre de membres et d'articulations touchées.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'arthrose est une maladie complexe et plurifactorielle affectant l'ensemble des tissus articulaires. En effet, elle est caractérisée par la dégradation progressive du cartilage, mais touche également la membrane synoviale et l'os sous-chondral. L'arthrose provoque une association de signes et symptômes dont les plus évocateurs sont la douleur mécanique, la raideur articulaire ou encore des craquements à la mobilisation.

À ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de guérir l'arthrose ou de retarder efficacement sa progression. Les traitements non pharmacologiques et pharmacologiques de cette pathologie sont essentiellement symptomatiques. En outre, certaines modalités pharmacologiques provoquent parfois des effets secondaires néfastes, limitant leur utilisation à long terme.

Une alternative thérapeutique plus efficace et plus saine est nécessaire. La nutrition pourrait être la solution. En effet, la nutrition peut fournir des bénéfices à long terme, une qualité utile à la gestion de maladies chroniques. Beaucoup d'actifs nutritionnels ont déjà été étudiés chez l'humain et chez le chien, avec différents niveaux de validité scientifique [204, 214, 239, 240].

Dans le cadre de notre travail, nous avons tenté d'améliorer les connaissances sur ce sujet. Nous avons évalué *in vitro* les effets de différents actifs nutritionnels sur les voies clés du métabolisme des chondrocytes. Par ailleurs, nous avons étudié *in vivo* l'influence d'un mélange d'actifs nutritionnels sur des chiens arthrosiques.

Au terme de ce travail *in vitro*, nous pouvons énoncer les conclusions qui suivent :

1. L'IL-1 β induit la synthèse de médiateurs inflammatoires et cataboliques et réduit la synthèse de facteurs anaboliques par les chondrocytes cultivés en monocouche.

L'IL-1 β augmentait la production du NO₂ et de PGE₂ et l'expression des gènes codant pour l'IL-6, iNOS, COX2, MMP-3, ADMATS4 et ADAMTS5 par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche. À l'inverse, l'IL-1 β limitait l'expression des gènes

codant pour l'AGG et le collagène de type II par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche. L'IL-1 β augmentait la production du NO₂, d'IL-6 et de MMP-3 par les chondrocytes humains cultivés en monocouche. Au contraire, l'IL-1 β diminuait la production des AGG par les chondrocytes humains cultivés en monocouche, dans les surnageants de culture.

2. L'IL-1 β et le mélange d'actifs nutritionnels COT ne sont pas cytotoxiques aux concentrations testées.

La viabilité cellulaire, évaluée par la libération de LDH et par le contenu en ADN, n'était modifiée ni par l'IL-1 β ni par les actifs nutritionnels, seuls ou en combinaison.

3. Le mélange d'actifs nutritionnels COT régule la synthèse de médiateurs clés de l'inflammation, du métabolisme du cartilage et de l'angiogenèse.

Le mélange d'actifs nutritionnels COT diminuait la production de NO₂ et de PGE₂ et l'expression des gènes IL-6, iNOS, COX-2, MMP-3, ADAMTS4 et ADAMTS5 par les chondrocytes bovins cultivés en monocouche stimulés par l'IL-1 β . COT réduisait la production basale d'MMP-3 par les chondrocytes humains cultivés en monocouche. Il atténuait aussi la production du NO₂, d'IL-6 et d'MMP-3 par les chondrocytes humains cultivés en monocouche stimulés par l'IL-1 β . Par ailleurs, l'expression des gènes CXCL6, MMP-13, BMP-2 et STC1, stimulée par l'IL-1 β , était fortement inhibée par COT. L'expression de la serpine E1 était inhibée par l'IL-1 β . COT bloquait complètement l'effet inhibiteur de l'IL-1 β . De plus, l'expression du gène serpine E1 était augmentée par COT en conditions basales.

4. Les actifs nutritionnels du mélange COT ont un effet synergique sur l'expression de COX-2, MMP-3 et ADAMTS-5, trois acteurs importants de la pathogénie de l'arthrose.

Sur les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β , les trois constituants du mélange d'actifs nutritionnels COT agissaient en synergie pour inhiber l'expression de COX-2, MMP-3 et ADAMTS5. Par ailleurs, ces trois actifs nutritionnels avaient un effet inhibiteur additif sur l'expression d'IL-6, iNOS et ADAMTS4 par les chondrocytes bovins stimulés à l'IL-1 β . Sur les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 β , les trois

actifs nutritionnels constituant le mélange COT agissaient en synergie pour inhiber la production d'IL-6. En outre, sur les chondrocytes humains, les trois actifs nutritionnels du mélange COT montraient un effet inhibiteur additif sur la production basale d'MMP-3 et sur la production induite par l'IL-1 β du NO₂.

5. COT inhibe l'activation de la voie de signalisation NF- κ B.

Le mélange d'actifs nutritionnels COT inhibait la phosphorylation d'I κ B α induite par l'IL-1 β et, par-là, sa dégradation. Le mélange COT diminuait également la phosphorylation de la sous-unité p65 induite par l'IL-1 β et par conséquent sa translocation nucléaire.

Pour résumer, ces expérimentations *in vitro* ont mis en évidence les mécanismes d'action de COT sur les chondrocytes. Elles suggèrent que COT pourrait avoir des effets bénéfiques sur le cartilage. Ces découvertes fournissent une base préclinique pour l'évaluation *in vivo* de la combinaison d'actifs nutritionnels COT.

Ce travail *in vitro* ouvre plusieurs perspectives de recherches :

- l'étude des effets du mélange COT sur un modèle de culture des chondrocytes en trois dimensions (par exemple billes d'alginate) ou sur des explants de cartilage ;
- l'étude de COT sur le métabolisme d'autres types cellulaires, comme les synoviocytes et les ostéoblastes ;
- l'étude de l'influence de COT sur la communication entre les chondrocytes, les synoviocytes et les ostéoblastes ;
- l'étude de COT sur des chondrocytes soumis à un stress oxydant.

La deuxième partie de notre recherche était consacrée à l'étude de la combinaison d'actifs nutritionnels COT sur des chiens de propriétaires arthrosiques. Les résultats suivants ont été obtenus:

1. Le mélange d'actifs nutritionnels COT n'induit pas d'effet secondaire néfaste chez les chiens arthrosiques.

L'aliment contenant le mélange COT était bien toléré. Il n'y avait ni de changement significatif dans le poids des chiens ni de démonstration d'effet secondaire néfaste.

2. Le mélange d'actifs nutritionnels COT est associé à une meilleure évolution du PFV, mais seulement chez les jeunes chiens.

Dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes (60^e percentile : 8,7 ans, âge moyen : $5,8 \pm 0,4$ ans, n=11 chiens du groupe test + 15 chiens du groupe contrôle), COT augmentait le PFV en comparaison avec le groupe contrôle.

3. Le mélange d'actifs nutritionnels COT réduit la douleur à la manipulation de l'articulation, évaluée par le vétérinaire.

La douleur à la manipulation de l'articulation, évaluée par le vétérinaire, était significativement réduite après trois mois dans le groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT, mais pas dans le groupe contrôle. De plus, la douleur à la manipulation de l'articulation était plus faible dans le groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT que dans le groupe contrôle.

4. Le mélange d'actifs nutritionnels COT prévient la sévérité de la douleur, évaluée par le propriétaire.

L'évolution de la sévérité de la douleur, évaluée par le propriétaire, était meilleure dans le groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT, en comparaison avec le groupe contrôle. En effet, la sévérité de la douleur tendait à s'améliorer dans le groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT et tendait à se détériorer dans le groupe de chiens contrôle. Dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes, la sévérité de la douleur augmentait dans le groupe contrôle, mais pas dans le groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT. L'évolution de la sévérité de la douleur était différente entre les deux groupes, en faveur du groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT.

5. Le mélange d'actifs nutritionnels COT est associé à une meilleure capacité des chiens à passer d'une position de repos à la position debout

L'interférence de la douleur sur la capacité des chiens à passer d'une position de repos à la position debout était plus faible dans le groupe de chiens ayant reçu l'aliment COT, par rapport au groupe contrôle.

En résumé, cette étude supportait l'hypothèse que les chiens ayant reçu un aliment contenant le mélange d'actifs nutritionnels COT exprimaient moins de douleur après trois mois. L'amélioration de la boiterie était meilleure dans le sous-groupe des chiens les plus jeunes. En outre, le mélange COT ne provoquait pas d'effet indésirable. Ces résultats donnent une justification scientifique supplémentaire pour l'utilisation de ces actifs nutritionnels dans la prise en charge de l'arthrose. Un aliment supplémenté avec le mélange d'actifs nutritionnels COT peut être recommandé pour des patients qui ne peuvent prendre d'AINS ou d'autres analgésiques pour atténuer leurs symptômes, ou en complément de ces interventions médicamenteuses.

Cette recherche a d'ailleurs abouti à la mise sur le marché dans plusieurs pays européens (Belgique, Espagne, Finlande, France, Grèce, Italie et Pays-Bas jusqu'à présent) mais aussi en Australie, en Chine, au Japon et en Russie d'un aliment canin enrichi avec le mélange d'actifs nutritionnels COT. Cet aliment est commercialisé par Royal Canin SAS sous l'appellation « Mobility C2P+ ». Le mélange d'actifs nutritionnels COT a été breveté.

Cette étude *in vivo* ouvre de nombreuses perspectives de recherche :

- l'étude de la pharmacocinétique des actifs nutritionnels dans le sang ;
- la mise au point d'une forme bio-optimisée de ce mélange COT, dans le but d'augmenter sa biodisponibilité ;
- la réalisation d'une étude plus longue et incluant un plus grand nombre de chiens ;
- l'étude des effets de COT sur l'incidence ou la progression des signes d'arthrose visibles en résonance magnétique ;
- l'étude de facteurs confondants tels que la sévérité de l'arthrose, l'âge, la localisation et le nombre d'articulations atteintes sur les effets du mélange COT ;

- la comparaison de COT à d'autres actifs nutritionnels disponibles sur le marché ;
- et, à plus long terme, la réalisation d'une étude clinique chez l'homme.

6 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Chevalier X, Richette P: **Normal joint cartilage: anatomy, physiology, metabolism, ageing.** *EMC - Rhumatologie - Orthopédie* 2005, **2**:41-58.
2. Campbell NA, Reece JB: **Biologie**, 2ème édition edn; 2006.
3. Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ: **Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(7):564-572.
4. Huberti HH, Hayes WC: **Patellofemoral contact pressures. The influence of q-angle and tendofemoral contact.** *J Bone Joint Surg Am* 1984, **66**(5):715-724.
5. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA: **The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.** *Sports health* 2009, **1**(6):461-468.
6. Maroudas A: **Transport of solutes through cartilage: permeability to large molecules.** *J Anat* 1976, **122**(Pt 2):335-347.
7. Arkill KP, Winlove CP: **Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(6):708-714.
8. Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckewaert A: **Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces.** *Lab Invest* 1983, **49**(3):309-316.
9. Grimshaw MJ, Mason RM: **Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**(5):386-392.
10. Chevalier X: **[Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage].** *Presse Med* 1998, **27**(2):75-80.
11. Vignon E: **[Structure and metabolism of articular cartilage].** *Pathol Biol (Paris)* 1971, **19**(15):771-785.
12. Thonar EJ, Masuda K, Manicourt DH, Kuettner KE: **Structure and function of normal human adult articular cartilage.** In: *Osteoarthritis, clinical and experimental aspects.* Edited by Springer. Berlin; 1999: 1-19.
13. Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.** *Instr Course Lect* 1998, **47**:477-486.
14. Heinegard D, Saxne T: **The role of the cartilage matrix in osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):50-56.
15. Torzilli PA: **Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition.** *J Orthop Res* 1985, **3**(4):473-483.
16. Mobasheri A, Vannucci SJ, Bondy CA, Carter SD, Innes JF, Arteaga MF, Trujillo E, Ferraz I, Shakibaei M, Martin-Vasallo P: **Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis.** *Histol Histopathol* 2002, **17**(4):1239-1267.
17. Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA: **Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes.** *Histol Histopathol* 2005, **20**(4):1327-1338.
18. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB: **Structure and function of aggrecan.** *Cell Res* 2002, **12**(1):19-32.

19. Nia HT, Ortiz C, Grodzinsky A: **Aggrecan: approaches to study biophysical and biomechanical properties.** *Methods Mol Biol* 2015, **1229**:221-237.
20. Eyre D: **Collagen of articular cartilage.** *Arthritis Res* 2002, **4**(1):30-35.
21. Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ, Pietka TA, Weis MA: **Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network.** *Biochem Soc Trans* 2002, **30**(Pt 6):893-899.
22. Camper L, Heinegard D, Lundgren-Akerlund E: **Integrin alpha2beta1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin.** *J Cell Biol* 1997, **138**(5):1159-1167.
23. Mansson B, Wenglen C, Morgelin M, Saxne T, Heinegard D: **Association of chondroadherin with collagen type II.** *J Biol Chem* 2001, **276**(35):32883-32888.
24. Acharya C, Yik JH, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR: **Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis.** *Matrix Biol* 2014, **37**:102-111.
25. Poole CA: **Articular cartilage chondrons: form, function and failure.** *J Anat* 1997, **191** (Pt 1):1-13.
26. Sobol E, Shekhter A, Guller A, Baum O, Baskov A: **Laser-induced regeneration of cartilage.** *J Biomed Opt* 2011, **16**(8):080902.
27. Jay GD, Harris DA, Cha CJ: **Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3)Gal-GalNAc oligosaccharides.** *Glycoconj J* 2001, **18**(10):807-815.
28. Teshima R, Ono M, Yamashita Y, Hirakawa H, Nawata K, Morio Y: **Immunohistochemical collagen analysis of the most superficial layer in adult articular cartilage.** *J Orthop Sci* 2004, **9**(3):270-273.
29. Sanchez C: **Mise au point d'un modèle de co-culture chondrocytes/ostéoblastes sous-chondraux humains.** Université de Liège; 2005.
30. Oprenyeszk F: **Mise au point d'un biomatériau à base de chitosan pour le traitement de l'arthrose.** Université de Liège; 2015.
31. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C: **L'os sous chondral et l'angiogenèse : deux nouvelles cibles thérapeutiques de l'arthrose.** *Réflexions rhumatologiques* 2012, **16**:19-21.
32. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F: **Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit.** *Invest Radiol* 2000, **35**(10):581-588.
33. Duncan H, Jundt J, Riddle JM, Pitchford W, Christopherson T: **The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study.** *J Bone Joint Surg Am* 1987, **69**(8):1212-1220.
34. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K: **Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint.** *Arch Histol Cytol* 2000, **63**(1):17-31.
35. Roy S, Bhawan J: **Bacterial phagocytosis by synovial cells.** *Lancet* 1971, **2**(7731):980.
36. Peeters-Joris C, Vaes G: **Degradation of cartilage proteoglycan and collagen by synovial cells. Stimulation by macrophages under activation by**

- phagocytosis, lymphocyte factors, bacterial products or other inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta* 1984, **804**(4):474-486.
37. Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K: **Secretory granules of B-cells in the synovial membrane. An ultrastructural and cytochemical study.** *Cell Tissue Res* 1981, **216**(1):131-141.
 38. Khan F, Ahmad SR: **Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application.** *Macromol Biosci* 2013, **13**(4):395-421.
 39. Smith MD: **The normal synovium.** *The open rheumatology journal* 2011, **5**:100-106.
 40. Ropes MW, Rossmeisl EC, Bauer W: **The Origin and Nature of Normal Human Synovial Fluid.** *J Clin Invest* 1940, **19**(6):795-799.
 41. Bonnevie ED, Galesso D, Secchieri C, Cohen I, Bonassar LJ: **Elastoviscous Transitions of Articular Cartilage Reveal a Mechanism of Synergy between Lubricin and Hyaluronic Acid.** *PLoS One* 2015, **10**(11):e0143415.
 42. Jay GD, Britt DE, Cha CJ: **Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts.** *J Rheumatol* 2000, **27**(3):594-600.
 43. Blewis ME, Lao BJ, Schumacher BL, Bugbee WD, Sah RL, Firestein GS: **Interactive cytokine regulation of synoviocyte lubricant secretion.** *Tissue Eng Part A* 2010, **16**(4):1329-1337.
 44. Decker B, Mc KB, Mc GW, Slocumb CH: **Comparative distribution of proteins and glycoproteins of serum and synovial fluid.** *Arthritis Rheum* 1959, **2**(2):162-177.
 45. Lee HG, Cowman MK: **An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution.** *Anal Biochem* 1994, **219**(2):278-287.
 46. Goldring MB: **Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines.** *Curr Rheumatol Rep* 2000, **2**(6):459-465.
 47. Jones EA, Crawford A, English A, Henshaw K, Mundy J, Corscadden D, Chapman T, Emery P, Hatton P, McGonagle D: **Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(6):1731-1740.
 48. de Sousa EB, Casado PL, Moura Neto V, Duarte ME, Aguiar DP: **Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives.** *Stem cell research & therapy* 2014, **5**(5):112.
 49. Cooper C, McAlindon T, Snow S, Vines K, Young P, Kirwan J, Dieppe P: **Mechanical and constitutional risk factors for symptomatic knee osteoarthritis: differences between medial tibiofemoral and patellofemoral disease.** *J Rheumatol* 1994, **21**(2):307-313.
 50. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Henrotin Y, Lohmander LS, Losina E, Onnerfjord P, Persiani S: **OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2015, **23**(5):686-697.
 51. Varady NH, Grodzinsky AJ: **Osteoarthritis year in review 2015: mechanics.** *Osteoarthritis Cartilage* 2016, **24**(1):27-35.
 52. Kemmler W, Teschler M, Goisser S, Bebenek M, von Stengel S, Bollheimer LC, Sieber CC, Freiberger E: **Prevalence of sarcopenia in Germany and the**

- corresponding effect of osteoarthritis in females 70 years and older living in the community: results of the FORMoSA study. *Clin Interv Aging* 2015, **10**:1565-1573.
53. Sanchez-Heran A, Agudo-Carmona D, Ferrer-Pena R, Lopez-de-Uralde-Villanueva I, Gil-Martinez A, Paris-Aleman A, La Touche R: **Postural Stability in Osteoarthritis of the Knee and Hip: Analysis of Association With Pain Catastrophizing and Fear-Avoidance Beliefs.** *PM R* 2015.
54. Franceschi C, Campisi J: **Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014, **69 Suppl 1**:S4-9.
55. Sharma P: **Inflammation and the metabolic syndrome.** *Indian J Clin Biochem* 2011, **26**(4):317-318.
56. Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Sari-Ali E, Rannou F, Borderie D: **Inter-relations between osteoarthritis and metabolic syndrome: A common link?** *Biochimie* 2016, **121**:238-252.
57. Scotece M, Mobasheri A: **Leptin in osteoarthritis: Focus on articular cartilage and chondrocytes.** *Life Sci* 2015, **140**:75-78.
58. Conde J, Scotece M, Lopez V, Gomez R, Lago F, Pino J, Gomez-Reino JJ, Gualillo O: **Adipokines: novel players in rheumatic diseases.** *Discov Med* 2013, **15**(81):73-83.
59. Scotece M, Conde J, Lopez V, Lago F, Pino J, Gomez-Reino JJ, Gualillo O: **Adiponectin and leptin: new targets in inflammation.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014, **114**(1):97-102.
60. Poonpet T, Honsawek S: **Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis?** *World journal of orthopedics* 2014, **5**(3):319-327.
61. Dahaghin S, Bierma-Zeinstra SM, Koes BW, Hazes JM, Pols HA: **Do metabolic factors add to the effect of overweight on hand osteoarthritis? The Rotterdam Study.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**(7):916-920.
62. Hawker GA, Croxford R, Bierman AS, Harvey PJ, Ravi B, Stanaitis I, Lipscombe LL: **All-cause mortality and serious cardiovascular events in people with hip and knee osteoarthritis: a population based cohort study.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e91286.
63. Guillemin F, Rat AC, Mazieres B, Pouchot J, Fautrel B, Euller-Ziegler L, Fardellone P, Morvan J, Roux CH, Verrouil E *et al*: **Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19**(11):1314-1322.
64. Van der Heyden J, Institut Scientifique de Santé Publique: **Affections Chroniques. Enquête Santé.** 2008.
65. Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P: **The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee.** *Deutsches Arzteblatt international* 2010, **107**(9):152-162.
66. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G: **A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(9):769-781.
67. Watt FE: **Hand osteoarthritis, menopause and menopausal hormone therapy.** *Maturitas* 2016, **83**:13-18.

68. Braga L, Renner JB, Schwartz TA, Woodard J, Helmick CG, Hochberg MC, Jordan JM: **Differences in radiographic features of knee osteoarthritis in African-Americans and Caucasians: the Johnston county osteoarthritis project.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(12):1554-1561.
69. Reynard LN, Loughlin J: **The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility.** *Expert reviews in molecular medicine* 2013, **15**:e2.
70. Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM: **Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee.** *Epidemiology* 1999, **10**(2):161-166.
71. Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM, Weissfeld LA: **Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study.** *Am J Epidemiol* 1994, **139**(2):119-129.
72. Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM: **Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2015, **54**(4):588-600.
73. Trayhurn P, Wood IS: **Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue.** *Br J Nutr* 2004, **92**(3):347-355.
74. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, Middelorp S, Huizinga TW, Kloppenburg M: **Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(4):761-765.
75. Henrotin Y: **Approche expérimentale de la pathogénie et du traitement de l'arthrose.** Liège: Université de Liège; 2003.
76. Salter DM, Buckwalter JA, Sandell L: **Pathology of OA.** In: *OARSI Primer*. 2010: 37-50.
77. Lane LB, Bullough PG: **Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage.** *J Bone Joint Surg Br* 1980, **62**(3):372-375.
78. Suri S, Gill SE, Massena de Camin S, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA: **Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**(11):1423-1428.
79. Hamerman D: **The biology of osteoarthritis.** *N Engl J Med* 1989, **320**(20):1322-1330.
80. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F: **Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(2):284-289.
81. Hwang HS, Kim HA: **Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**(11):26035-26054.
82. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB: **Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(1):13-29.
83. Uygur E, Kilic B, Demiroglu M, Ozkan K, Turan Cift H: **Subchondral Bone and Its Role in Osteoarthritis.** *Open Journal of Orthopedics* 2015, **5**:355-360.

84. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour JP, Msika P, Baudouin C, Henrotin YE: **Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(4):1193-1203.
85. Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD: **Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(12):3178-3184.
86. Intema F, Hazewinkel HA, Gouwens D, Bijlsma JW, Weinans H, Lafeber FP, Mastbergen SC: **In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: results from a canine ACLT-meniscectomy model.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(5):691-698.
87. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP: **Subchondral bone in osteoarthritis.** *Calcif Tissue Int* 1991, **49**(1):20-26.
88. Amini M, Nazemi SM, Lanovaz JL, Kontulainen S, Masri BA, Wilson DR, Szyszkowski W, Johnston JD: **Individual and combined effects of OA-related subchondral bone alterations on proximal tibial surface stiffness: a parametric finite element modeling study.** *Med Eng Phys* 2015, **37**(8):783-791.
89. Sanchez C, Deberg MA, Bellahcene A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, Crielaard JM, Henrotin YE: **Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(2):442-455.
90. van der Kraan PM, van den Berg WB: **Osteophytes: relevance and biology.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(3):237-244.
91. Junker S, Krumbholz G, Frommer KW, Rehart S, Steinmeyer J, Rickert M, Schett G, Muller-Ladner U, Neumann E: **Differentiation of osteophyte types in osteoarthritis - proposal of a histological classification.** *Joint Bone Spine* 2016, **83**(1):63-67.
92. Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C, Zheng MH: **Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes.** *Arthritis Res Ther* 2013, **15**(6):223.
93. Wang Y, Teichtahl AJ, Cicuttini FM: **Osteoarthritis year in review 2015: imaging.** *Osteoarthritis Cartilage* 2016, **24**(1):49-57.
94. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C: **Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives.** *Biomed Mater Eng* 2009, **19**(4-5):311-316.
95. Silvestri E, Corazza A, Molfetta L, Garlaschi G: **Metabolic Bone Changes in Osteoarthritis: The Role of Imaging and Pathogenetic Interpretation.** *J Biol Regul Homeost Agents* 2015, **29**(3):737-743.
96. Link TM, Li X: **Bone marrow changes in osteoarthritis.** *Semin Musculoskelet Radiol* 2011, **15**(3):238-246.
97. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Goggins J, Amin S, LaValley MP, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson DT: **Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(5):1529-1535.
98. Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T: **Subtyping of osteoarthritic synoviopathy.** *Clin Exp Rheumatol* 2002, **20**(5):633-640.

99. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B: **Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis**. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(9):1263-1267.
100. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, Goebel JC, Mainard D, Blum A, Pourel J *et al*: **Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity**. *Arthritis Rheum* 2005, **52**(11):3492-3501.
101. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P: **The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies**. *Ann Rheum Dis* 1988, **47**(4):300-307.
102. Myers SL, Brandt KD, Ehlich JW, Braunstein EM, Shelbourne KD, Heck DA, Kalasinski LA: **Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee**. *J Rheumatol* 1990, **17**(12):1662-1669.
103. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TW, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, DeGroot J: **MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis**. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(5):694-698.
104. Stankovska M, Hrabarova E, Valachova K, Molnarova M, Gemeiner P, Soltes L: **The degradative action of peroxynitrite on high-molecular-weight hyaluronan**. *Neuro endocrinology letters* 2006, **27 Suppl 2**:31-34.
105. Soltes L, Stankovska M, Kogan G, Gemeiner P, Stern R: **Contribution of oxidative-reductive reactions to high-molecular-weight hyaluronan catabolism**. *Chemistry & biodiversity* 2005, **2**(9):1242-1245.
106. Chow G, Knudson CB, Knudson W: **Human hyaluronidase-2 is localized intracellularly in articular chondrocytes and other cultured cell lines**. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(12):1312-1314.
107. Noble PW: **Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair**. *Matrix Biol* 2002, **21**(1):25-29.
108. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S: **Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid**. *Science* 1985, **228**(4705):1324-1326.
109. Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L: **Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis**. *Curr Opin Rheumatol* 2002, **14**(5):578-584.
110. Aigner T, Dudhia J: **Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: A hypothesis**. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997, **56**(5):287-291.
111. Lorenz H, Richter W: **Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage**. *Prog Histochem Cytochem* 2006, **40**(3):135-163.
112. Pesesse L: **Contribution à l'étude de la néo-vascularisation du cartilage arthrosique. Identification de la bone sialoprotein comme facteur clé dans l'arthrose.**; 2014.
113. Pfander D, Swoboda B, Kirsch T: **Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes**. *American Journal of Pathology* 2001, **159**(5):1777-1783.

114. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger DL, Kakonen SM, Swoboda B: **Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: Expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.** *Calcified Tissue Int* 2000, **67**(3):230-240.
115. Terkeltaub R, Lotz M, Johnson K, Deng D, Hashimoto S, Goldring MB, Burton D, Deftos LJ: **Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate.** *Arthritis and rheumatism* 1998, **41**(12):2152-2164.
116. Kirsch T, Swoboda B, Nah H: **Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**(4):294-302.
117. Karpouzas GA, Terkeltaub RA: **New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification.** *Current rheumatology reports* 1999, **1**(2):121-127.
118. Radin EL, Paul IL, Tolkoff MJ: **Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease.** *Arthritis and rheumatism* 1970, **13**(4):400-405.
119. Fazzalari NL, Moore RJ, Manthey BA, Vernon-Roberts B: **Comparative study of iliac crest and subchondral femoral bone in osteoarthritic patients.** *Bone* 1992, **13**(4):331-335.
120. Dequeker J, Mokassa L, Aerssens J, Boonen S: **Bone density and local growth factors in generalized osteoarthritis.** *Microscopy research and technique* 1997, **37**(4):358-371.
121. Felson DT, Neogi T: **Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone?** *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(2):341-344.
122. Lories RJ, Luyten FP: **The bone-cartilage unit in osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):43-49.
123. Kwan Tat S, Amiable N, Pelletier JP, Boileau C, Lajeunesse D, Duval N, Martel-Pelletier J: **Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2009, **48**(12):1482-1490.
124. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE: **Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(11):979-987.
125. Corrado A, Neve A, Cantatore FP: **Expression of vascular endothelial growth factor in normal, osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts.** *Clin Exp Med* 2013, **13**(1):81-84.
126. Sanchez C, Deberg MA, Bellahcene A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, Crielaard JM, Henrotin YE: **Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(2):442-455.
127. Nalbant S, Martinez JA, Kitumnuaypong T, Clayburne G, Sieck M, Schumacher HR, Jr.: **Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity:**

- new findings from sequential studies. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11(1):50-54.**
128. Henrotin Y, Sanchez C, Reginster JY: **The inhibition of metalloproteinases to treat osteoarthritis : reality and new perspectives. *Expert Opinion* 2002, 12:29-43.**
129. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000, 59(6):455-461.**
130. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE: **Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996, 97(3):761-768.**
131. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G: **Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996, 271(3):1544-1550.**
132. Yoshida M, Tsuji M, Funasaki H, Kan I, Fujii K: **Analysis for the major contributor of collagenase to the primary cleavage of type II collagens in cartilage degradation. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 2005, 15(3):180-186.**
133. Alaaeddine N, Antoniou J, Moussa M, Hilal G, Kreichaty G, Ghanem I, Abouchdid W, Saghbini E, Di Battista JA: **The chemokine CCL20 induces proinflammatory and matrix degradative responses in cartilage. *Inflamm Res* 2015, 64(9):721-731.**
134. Nakki A, Rodriguez-Fontela C, Gonzalez A, Harilainen A, Leino-Arjas P, Heliovaara M, Eriksson J, Tallroth K, Videman T, Kaprio J *et al*: **Association study of MMP8 gene in osteoarthritis. *Connect Tissue Res* 2015.**
135. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: **Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006, 11:529-543.**
136. Nagase H, Woessner JF, Jr.: **Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274(31):21491-21494.**
137. Knauper V, Wilhelm SM, Seperack PK, DeClerck YA, Langley KE, Osthues A, Tschesche H: **Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem J* 1993, 295 (Pt 2):581-586.**
138. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ: **Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 1987, 248(1):265-268.**
139. Li NG, Tang YP, Duan JA, Shi ZH: **Matrix metalloproteinase inhibitors: a patent review (2011 - 2013). *Expert opinion on therapeutic patents* 2014, 24(9):1039-1052.**
140. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP: **Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994, 70(6):807-815.**
141. Ilic MZ, Handley CJ, Robinson HC, Mok MT: **Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1992, 294(1):115-122.**

142. Fosang AJ, Rogerson FM: **Identifying the human aggrecanase.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(9):1109-1116.
143. Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, Lohmander LS: **The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain.** *J Clin Invest* 1992, **89**(5):1512-1516.
144. Swingler TE, Waters JG, Davidson RK, Pennington CJ, Puente XS, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Guile GR, Wang W *et al*: **Degradome expression profiling in human articular cartilage.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(3):R96.
145. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B: **Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **251**(3):824-829.
146. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D: **The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis.** *Mediators Inflamm* 2014, **2014**:561459.
147. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H: **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):33-42.
148. Piccioli P, Rubartelli A: **The secretion of IL-1beta and options for release.** *Semin Immunol* 2013, **25**(6):425-429.
149. Symons JA, Young PR, Duff GW: **Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(5):1714-1718.
150. Palmer G, Guerne PA, Mezin F, Maret M, Guicheux J, Goldring MB, Gabay C: **Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes.** *Arthritis Res* 2002, **4**(3):226-231.
151. Boraschi D, Tagliabue A: **The interleukin-1 receptor family.** *Semin Immunol* 2013, **25**(6):394-407.
152. Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor.** *Lab Invest* 1995, **73**(3):347-355.
153. Aggarwal BB: **Nuclear factor-kappa B: a transcription factor for all seasons.** *Expert Opin Ther Targets* 2007, **11**(2):109-110.
154. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, Mobasheri A: **Curcumin protects human chondrocytes from IL-1beta-induced inhibition of collagen type II and beta1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study.** *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2005, **187**(5-6):487-497.
155. Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP: **Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro.** *Pathobiology* 2000, **68**(3):144-149.
156. Meszaros E, Malemud CJ: **Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity.** *Therapeutic advances in chronic disease* 2012, **3**(5):219-229.

157. Verma P, Dalal K: **ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis.** *J Cell Biochem* 2011, **112**(12):3507-3514.
158. Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A, Clark IM, Cawston TE: **The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(4):961-967.
159. Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasheri A: **Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis.** *Vet J* 2003, **166**(2):140-158.
160. Lopez-Armada MJ, Carames B, Lires-Dean M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ: **Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(7):660-669.
161. Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J: **The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation.** *Osteoarthritis Cartilage* 1996, **4**(1):77-84.
162. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: **The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.** *Biorheology* 2002, **39**(1-2):237-246.
163. El Mansouri FE, Chabane N, Zayed N, Kapoor M, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Fahmi H: **Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(1):168-179.
164. Henderson B, Pettipher ER: **Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo.** *Clin Exp Immunol* 1989, **75**(2):306-310.
165. Poree B, Kypriotou M, Chadjichristos C, Beauchef G, Renard E, Legendre F, Melin M, Gueret S, Hartmann DJ, Mallein-Gerin F *et al*: **Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter.** *J Biol Chem* 2008, **283**(8):4850-4865.
166. Chenoufi HL, Diamant M, Rieneck K, Lund B, Stein GS, Lian JB: **Increased mRNA expression and protein secretion of interleukin-6 in primary human osteoblasts differentiated in vitro from rheumatoid and osteoarthritic bone.** *J Cell Biochem* 2001, **81**(4):666-678.
167. Sun JM, Sun LZ, Liu J, Su BH, Shi L: **Serum interleukin-15 levels are associated with severity of pain in patients with knee osteoarthritis.** *Dis Markers* 2013, **35**(3):203-206.
168. Scanzello CR, Umoh E, Pessler F, Diaz-Torne C, Miles T, Dicarolo E, Potter HG, Mandl L, Marx R, Rodeo S *et al*: **Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(8):1040-1048.

169. Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P, Martel-Pelletier J: **Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta.** *J Rheumatol* 2002, **29**(6):1262-1272.
170. Honorati MC, Bovera M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A: **Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(10):799-807.
171. Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A: **Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(4):345-352.
172. Honorati MC, Cattini L, Facchini A: **VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF-alpha.** *Connect Tissue Res* 2007, **48**(5):239-245.
173. Dai SM, Shan ZZ, Nishioka K, Yudoh K: **Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(5):735-742.
174. Inoue H, Hiraoka K, Hoshino T, Okamoto M, Iwanaga T, Zenmyo M, Shoda T, Aizawa H, Nagata K: **High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis.** *Bone* 2008, **42**(6):1102-1110.
175. John T, Kohl B, Mobasheri A, Ertel W, Shakibaei M: **Interleukin-18 induces apoptosis in human articular chondrocytes.** *Histol Histopathol* 2007, **22**(5):469-482.
176. van Lent PL, Holthuysen AE, Sloetjes A, Lubberts E, van den Berg WB: **Local overexpression of adeno-viral IL-4 protects cartilage from metalloproteinase-induced destruction during immune complex-mediated arthritis by preventing activation of pro-MMPs.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(3):234-243.
177. van Meegeren ME, Roosendaal G, Jansen NW, Wenting MJ, van Wesel AC, van Roon JA, Lafeber FP: **IL-4 alone and in combination with IL-10 protects against blood-induced cartilage damage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(7):764-772.
178. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM: **IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes.** *J Clin Invest* 1995, **96**(5):2304-2310.
179. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I *et al*: **IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts.** *J Immunol* 1996, **156**(2):758-764.
180. Henrotin Y, Deby-Dupont G, Deby C, De Bruyn M, Lamy M, Franchimont P: **Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes.** *Br J Rheumatol* 1993, **32**(7):562-567.
181. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A: **Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases.** *Joint Bone Spine* 2007, **74**(4):324-329.

182. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP: **The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**(10):747-755.
183. Lotz M: **The role of nitric oxide in articular cartilage damage.** *Rheum Dis Clin North Am* 1999, **25**(2):269-282.
184. Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI: **Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis.** *J Orthop Sci* 2003, **8**(6):849-857.
185. Bara JJ, Johnson WE, Caterson B, Roberts S: **Articular cartilage glycosaminoglycans inhibit the adhesion of endothelial cells.** *Connect Tissue Res* 2012, **53**(3):220-228.
186. Hiraki Y, Shukunami C: **Chondromodulin-I as a novel cartilage-specific growth-modulating factor.** *Pediatr Nephrol* 2000, **14**(7):602-605.
187. Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, Fisher LW, Castronovo V: **Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis.** *Circ Res* 2000, **86**(8):885-891.
188. Pfander D, Cramer T, Deuerling D, Weseloh G, Swoboda B: **Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**(6):448-454.
189. Law AY, Wong CK: **Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways.** *Mol Cell Endocrinol* 2013, **374**(1-2):73-81.
190. Pesesse L, Sanchez C, Walsh DA, Delcour JP, Baudouin C, Msika P, Henrotin Y: **Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2014, **22**(4):547-556.
191. Walsh DA, Pearson CI: **Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases.** *Arthritis Res* 2001, **3**(3):147-153.
192. Cho H, Walker A, Williams J, Hasty KA: **Study of osteoarthritis treatment with anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase-2 inhibitor and steroids.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**:595273.
193. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H: **Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues.** *Semin Arthritis Rheum* 2003, **33**(3):155-167.
194. Vos LM, Kuijer R, Huddleston Slater JJ, Bulstra SK, Stegenga B: **Inflammation is more distinct in temporomandibular joint osteoarthritis compared to the knee joint.** *J Oral Maxillofac Surg* 2014, **72**(1):35-40.
195. Nelson AE, Allen KD, Golightly YM, Goode AP, Jordan JM: **A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative.** *Semin Arthritis Rheum* 2014, **43**(6):701-712.
196. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M *et al*: **OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(9):981-1000.

197. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M *et al*: **OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(2):137-162.
198. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M *et al*: **OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(4):476-499.
199. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, Hawker GA, Henrotin Y, Hunter DJ, Kawaguchi H *et al*: **OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2014, **22**(3):363-388.
200. Bennell KL, Hall M, Hinman RS: **Osteoarthritis year in review 2015: rehabilitation and outcomes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2016, **24**(1):58-70.
201. Clegg TE, Caborn D, Mauffrey C: **Viscosupplementation with hyaluronic acid in the treatment for cartilage lesions: a review of current evidence and future directions.** *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie* 2013, **23**(2):119-124.
202. Johnston SA: **Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997, **27**(4):699-723.
203. Paster ER, LaFond E, Biery DN, Iriye A, Gregor TP, Shofer FS, Smith GK: **Estimates of prevalence of hip dysplasia in Golden Retrievers and Rottweilers and the influence of bias on published prevalence figures.** *J Am Vet Med Assoc* 2005, **226**(3):387-392.
204. Henrotin Y, Sanchez C, Balligand M: **Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: present and future perspectives.** *Vet J* 2005, **170**(1):113-123.
205. Comerford EJ, Smith K, Hayashi K: **Update on the aetiopathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease.** *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011, **24**(2):91-98.
206. Marshall W, Bockstahler B, Hulse D, Carmichael S: **A review of osteoarthritis and obesity: current understanding of the relationship and benefit of obesity treatment and prevention in the dog.** *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 2009, **22**(5):339-345.
207. Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Lust G, Biery DN, Smith GK, Mantz SL: **Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs.** *J Am Vet Med Assoc* 2000, **217**(11):1678-1680.
208. Marshall WG, Hazewinkel HA, Mullen D, De Meyer G, Baert K, Carmichael S: **The effect of weight loss on lameness in obese dogs with osteoarthritis.** *Vet Res Commun* 2010, **34**(3):241-253.
209. Desrochers J, Amrein MW, Matyas JR: **Viscoelasticity of the articular cartilage surface in early osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(5):413-421.

210. Aragon CL, Hofmeister EH, Budsberg SC: **Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs.** *J Am Vet Med Assoc* 2007, **230**(4):514-521.
211. Moreau M, Dupuis J, Bonneau NH, Desnoyers M: **Clinical evaluation of a nutraceutical, carprofen and meloxicam for the treatment of dogs with osteoarthritis.** *Vet Rec* 2003, **152**(11):323-329.
212. Forsyth SF, Guilford WG, Haslett SJ, Godfrey J: **Endoscopy of the gastroduodenal mucosa after carprofen, meloxicam and ketoprofen administration in dogs.** *J Small Anim Pract* 1998, **39**(9):421-424.
213. Monteiro-Steagall BP, Steagall PV, Lascelles BD: **Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs.** *J Vet Intern Med* 2013, **27**(5):1011-1019.
214. Comblain F, Serisier S, Barthelemy N, Balligand M, Henrotin Y: **Review of dietary supplements for the management of osteoarthritis in dogs in studies from 2004 to 2014.** *J Vet Pharmacol Ther* 2015.
215. Gupta RC, Canerdy TD, Lindley J, Konemann M, Minniear J, Carroll BA, Hendrick C, Goad JT, Rohde K, Doss R *et al*: **Comparative therapeutic efficacy and safety of type-II collagen (UC-II), glucosamine and chondroitin in arthritic dogs: pain evaluation by ground force plate.** *J Anim Physiol Anim Nutr* 2012, **96**(5):770-777.
216. Altilio M, Peal A, Alvey M, Simms C, Curtsinger A, Gupta RC, Canerdy TD, Goad JT, Bagchi M, Bagchi D: **Therapeutic Efficacy and Safety of Undenatured Type II Collagen Singly or in Combination with Glucosamine and Chondroitin in Arthritic Dogs.** *Toxicol Mech Methods* 2007, **17**(4):189-196.
217. McCarthy G, O'Donovan J, Jones B, McAllister H, Seed M, Mooney C: **Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis.** *Vet J* 2007, **174**(1):54-61.
218. Beynen AC, Van Geene HW, Grim HV, Jacobs P, Van der Vlerk T: **Oral Administration of Gelatin Hydrolysate Reduces Clinical Signs of Canine Osteoarthritis in a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.** *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 2010, **5**(2):102-106.
219. Peal A, D'Altilio M, Simms C, Alvey M, Gupta RC, Goad JT, Canerdy TD, Bagchi M, Bagchi D: **Therapeutic efficacy and safety of undenatured type-II collagen (UC-II) alone or in combination with (-)-hydroxycitric acid and chromemate in arthritic dogs.** *J Vet Pharmacol Ther* 2007, **30**(3):275-278.
220. Deparle LA, Gupta RC, Canerdy TD, Goad JT, D'Altilio M, Bagchi M, Bagchi D: **Efficacy and safety of glycosylated undenatured type-II collagen (UC-II) in therapy of arthritic dogs.** *J Vet Pharmacol Ther* 2005, **28**(4):385-390.
221. Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Msika P, Guillou GB, Baudouin C, Pelletier JP: **Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(2):R41.
222. Altinel L, Saritas ZK, Kose KC, Pamuk K, Aksoy Y, Serteser M: **Treatment with unsaponifiable extracts of avocado and soybean increases TGF-beta1 and**

- TGF-beta2 levels in canine joint fluid.** *Tohoku J Exp Med* 2007, **211**(2):181-186.
223. Colitti M, Gaspardo B, Della Pria A, Scaini C, Stefanon B: **Transcriptome modification of white blood cells after dietary administration of curcumin and non-steroidal anti-inflammatory drug in osteoarthritic affected dogs.** *Vet Immunol Immunopathol* 2012, **147**(3-4):136-146.
224. Innes JF, Fuller CJ, Grover ER, Kelly AL, Burn JF: **Randomised, double-blind, placebo-controlled parallel group study of P54FP for the treatment of dogs with osteoarthritis.** *Vet Rec* 2003, **152**(15):457-460.
225. Hielm-Bjorkman A, Roine J, Elo K, Lappalainen A, Junnila J, Laitinen-Vapaavuori O: **An un-commissioned randomized, placebo-controlled double-blind study to test the effect of deep sea fish oil as a pain reliever for dogs suffering from canine OA.** *BMC Vet Res* 2012, **8**:157.
226. Fritsch D, Allen TA, Dodd CE, Jewell DE, Sixby KA, Leventhal PS, Hahn KA: **Dose-titration effects of fish oil in osteoarthritic dogs.** *J Vet Intern Med* 2010, **24**(5):1020-1026.
227. Fritsch DA, Allen TA, Dodd CE, Jewell DE, Sixby KA, Leventhal PS, Brejda J, Hahn KA: **A multicenter study of the effect of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on carprofen dosage in dogs with osteoarthritis.** *J Am Vet Med Assoc* 2010, **236**(5):535-539.
228. Roush JK, Cross AR, Renberg WC, Dodd CE, Sixby KA, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Richardson DC, Leventhal PS *et al*: **Evaluation of the effects of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on weight bearing in dogs with osteoarthritis.** *J Am Vet Med Assoc* 2010, **236**(1):67-73.
229. Roush JK, Dodd CE, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Schoenherr WD, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA: **Multicenter veterinary practice assessment of the effects of omega-3 fatty acids on osteoarthritis in dogs.** *J Am Vet Med Assoc* 2010, **236**(1):59-66.
230. Hansen RA, Harris MA, Pluhar GE, Motta T, Brevard S, Ogilvie GK, Fettman MJ, Allen KG: **Fish oil decreases matrix metalloproteinases in knee synovia of dogs with inflammatory joint disease.** *J Nutr Biochem* 2008, **19**(2):101-108.
231. LeBlanc CJ, Horohov DW, Bauer JE, Hosgood G, Mauldin GE: **Effects of dietary supplementation with fish oil on in vivo production of inflammatory mediators in clinically normal dogs.** *Am J Vet Res* 2008, **69**(4):486-493.
232. Riialand P, Bichot S, Lussier B, Moreau M, Beaudry F, del Castillo JR, Gauvin D, Troncy E: **Effect of a diet enriched with green-lipped mussel on pain behavior and functioning in dogs with clinical osteoarthritis.** *Can J Vet Res* 2013, **77**(1):66-74.
233. Hielm-Bjorkman A, Tulamo RM, Salonen H, Raekallio M: **Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part I: Green-lipped Mussel (*Perna canaliculus*).** *Evid Based Complement Alternat Med* 2009, **6**(3):365-373.
234. Pollard B, Guilford WG, Ankenbauer-Perkins KL, Hedderley D: **Clinical efficacy and tolerance of an extract of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) in dogs presumptively diagnosed with degenerative joint disease.** *N Z Vet J* 2006, **54**(3):114-118.

235. Servet E, Biourge V, Marniquet P: **Dietary intervention can improve clinical signs in osteoarthritic dogs.** *J Nutr* 2006, **136**(7 Suppl):1995S-1997S.
236. Carter GT, Duong V, Ho S, Ngo KC, Greer CL, Weeks DL: **Side effects of commonly prescribed analgesic medications.** *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2014, **25**(2):457-470.
237. Sharma L: **Osteoarthritis year in review 2015: clinical.** *Osteoarthritis Cartilage* 2016, **24**(1):36-48.
238. Kalra EK: **Nutraceutical--definition and introduction.** *AAPS PharmSci* 2003, **5**(3):E25.
239. Henrotin Y, Lambert C, Couchourel D, Ripoll C, Chiotelli E: **Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19**(1):1-21.
240. Ameye LG, Chee WS: **Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**(4):R127.
241. Schadow S, Siebert HC, Lochnit G, Kordelle J, Rickert M, Steinmeyer J: **Collagen metabolism of human osteoarthritic articular cartilage as modulated by bovine collagen hydrolysates.** *PLoS One* 2013, **8**(1):e53955.
242. EFSA: **Opinion of the Food Safety Authority on safety of collagen and a processing method for the production of collagen.** *European Food Safety Authority Journal* 2005, **174**:1-9.
243. Walrand S, Chiotelli E, Noirt F, Mwewa S, Lassel T: **Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma.** *J Agric Food Chem* 2008, **56**(17):7790-7795.
244. Schunck M, Schulze C, Oesser S: **Disparate efficacy of collagen hydrolysate and glucosamine on the extracellular matrix metabolism of articular chondrocytes.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, **14**(S114 (Abstract)).
245. Oesser S, Seifert J: **Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen.** *Cell Tissue Res* 2003, **311**(3):393-399.
246. Henrotin Y, Clutterbuck AL, Allaway D, Ludwig EM, Harris P, Mathy-Hartert M, Shakibaei M, Mobasheri A: **Biological actions of curcumin on articular chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(2):141-149.
247. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Sendzik J, John T, Shakibaei M: **Effects of curcumin (diferuloylmethane) on nuclear factor kappaB signaling in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1030**:578-586.
248. Mathy M, Sanchez C, Priem F, Henrotin Y: **Curcumin inhibits interleukin-6, -8, nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis by bovine chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**:C115 (Abstract).
249. Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A: **Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis.** *Biochem Pharmacol* 2007, **73**(9):1434-1445.

250. Mathy-Hartert M, Jacquemond-Collet I, Priem F, Sanchez C, Lambert C, Henrotin Y: **Curcumin inhibits pro-inflammatory mediators and metalloproteinase-3 production by chondrocytes.** *Inflamm Res* 2009, **58**(12):899-908.
251. Henrotin Y, Priem F, Mobasheri A: **Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management.** *Springerplus* 2013, **2**(1):56.
252. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS: **Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers.** *Planta Med* 1998, **64**(4):353-356.
253. Qiu S, Liu Z, Hou L, Li Y, Wang J, Wang H, Du W, Wang W, Qin Y, Liu Z: **Complement activation associated with polysorbate 80 in beagle dogs.** *Int Immunopharmacol* 2013, **15**(1):144-149.
254. Helson L, Bolger G, Majeed M, Vcelar B, Pucaj K, Matabudul D: **Infusion pharmacokinetics of Lipocurc (liposomal curcumin) and its metabolite tetrahydrocurcumin in Beagle dogs.** *Anticancer Res* 2012, **32**(10):4365-4370.
255. Rasheed Z, Anbazhagan AN, Akhtar N, Ramamurthy S, Voss FR, Haqqi TM: **Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits advanced glycation end product-induced expression of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-13 in human chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(3):R71.
256. Akhtar N, Haqqi TM: **Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1beta-induced inflammatory response in human chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**(3):R93.
257. Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM: **Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **308**(2):767-773.
258. Serisier S, Leray V, Poudroux W, Magot T, Ouguerram K, Nguyen P: **Effects of green tea on insulin sensitivity, lipid profile and expression of PPARalpha and PPARgamma and their target genes in obese dogs.** *Br J Nutr* 2008, **99**(6):1208-1216.
259. Swezey RR, Aldridge DE, LeValley SE, Crowell JA, Hara Y, Green CE: **Absorption, tissue distribution and elimination of 4-[(3)h]-epigallocatechin gallate in beagle dogs.** *Int J Toxicol* 2003, **22**(3):187-193.
260. Sukanuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H: **Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue.** *Carcinogenesis* 1998, **19**(10):1771-1776.
261. EuropeanCommission: **Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003.** . In: *Appendixes 3 & 4 Annex : List of additives* 51 edn: Directorate D - Animal Health and Welfare Unit D2 - Feed 2009.
262. Yoo EA, Kim SD, Lee WM, Park HJ, Kim SK, Cho JY, Min W, Rhee MH: **Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from Aloe saponaria Haw.** *Phytother Res* 2008, **22**(10):1389-1395.
263. Henrotin YE, Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Guillou GB, Msika P, Reginster JY: **Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and**

- reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol* 2003, **30**(8):1825-1834.
264. Wann AK, Mistry J, Blain EJ, Michael-Titus AT, Knight MM: **Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce interleukin-1beta-mediated cartilage degradation.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(6):R207.
265. Pearson W, Orth MW, Karrow NA, Maclusky NJ, Lindinger MI: **Anti-inflammatory and chondroprotective effects of nutraceuticals from Sasha's Blend in a cartilage explant model of inflammation.** *Mol Nutr Food Res* 2007, **51**(8):1020-1030.
266. Schulze-Tanzil G, de SP, Behnke B, Klingelhofer S, Scheid A, Shakibaei M: **Effects of the antirheumatic remedy hox alpha--a new stinging nettle leaf extract--on matrix metalloproteinases in human chondrocytes in vitro.** *Histol Histopathol* 2002, **17**(2):477-485.
267. Feng WY, Tanaka R, Inagaki Y, Saitoh Y, Chang MO, Amet T, Yamamoto N, Yamaoka S, Yoshinaka Y: **Pycnogenol, a procyanidin-rich extract from French maritime pine, inhibits intracellular replication of HIV-1 as well as its binding to host cells.** *Jpn J Infect Dis* 2008, **61**(4):279-285.
268. Shakibaei M, Mobasheri A, Buhrmann C: **Curcumin synergizes with resveratrol to stimulate the MAPK signaling pathway in human articular chondrocytes in vitro.** *Genes Nutr* 2011, **6**(2):171-179.
269. Labarca C, Paigen K: **A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure.** *Anal Biochem* 1980, **102**(2):344-352.
270. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids.** *Anal Biochem* 1982, **126**(1):131-138.
271. Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, Im HJ: **A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain.** *Gene* 2013, **527**(2):440-447.
272. Malemud CJ: **Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date.** *Drugs Aging* 2010, **27**(2):95-115.
273. Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, Deby-Dupont G, Crielaard JM, Henrotin Y: **Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(7):756-763.
274. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR: **Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(1):128-135.
275. Daheshia M, Yao JQ: **The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis.** *J Rheumatol* 2008, **35**(12):2306-2312.
276. Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M: **Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(6):R165.
277. Sahebkar A, Henrotin Y: **Analgesic Efficacy and Safety of Curcuminoids in Clinical Practice: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.** *Pain Med* 2015.

278. Ohara H, Iida H, Ito K, Takeuchi Y, Nomura Y: **Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2010, **74**(10):2096-2099.
279. Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M: **Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(12):1620-1627.
280. Heinecke LF, Grzanna MW, Au AY, Mochal CA, Rashmir-Raven A, Frondoza CG: **Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(2):220-227.
281. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A: **Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis.** *Biochem Pharmacol* 2008, **76**(11):1426-1439.
282. Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M: **Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**(3):677-687.
283. Shakibaei M, John T, Seifarth C, Mobasheri A: **Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1095**:554-563.
284. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, Abramson SB: **The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(9):2786-2797.
285. Collodoro M, Lemaire P, Eppe G, Bertrand V, Dobson R, Mazzucchelli G, Widart J, De Pauw E, De Pauw-Gillet MC: **Identification and quantification of concentration-dependent biomarkers in MCF-7/BOS cells exposed to 17beta-estradiol by 2-D DIGE and label-free proteomics.** *J Proteomics* 2012, **75**(14):4555-4569.
286. Dip R, Lenz S, Gmuender H, Naegeli H: **Pleiotropic combinatorial transcriptomes of human breast cancer cells exposed to mixtures of dietary phytoestrogens.** *Food Chem Toxicol* 2009, **47**(4):787-795.
287. Comblain F, Sanchez C, Lespoune I, Balligand M, Serisier S, Henrotin Y: **Curcuminoids Extract, Hydrolyzed Collagen and Green Tea Extract Synergically Inhibit Inflammatory and Catabolic Mediator's Synthesis by Normal Bovine and Osteoarthritic Human Chondrocytes in Monolayer.** *PLoS One* 2015, **10**(3):e0121654.
288. Ramos YF, Meulenbelt I: **Implementation of Functional Genomics for Bench-to-Bedside Transition in Osteoarthritis.** *Curr Rheumatol Rep* 2015, **17**(8):53.
289. Scaife S, Brown R, Kellie S, Filer A, Martin S, Thomas AM, Bradfield PF, Amft N, Salmon M, Buckley CD: **Detection of differentially expressed genes in synovial fibroblasts by restriction fragment differential display.** *Rheumatology (Oxford)* 2004, **43**(11):1346-1352.

290. Sandell LJ, Xing X, Franz C, Davies S, Chang LW, Patra D: **Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1beta.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(12):1560-1571.
291. Hashimoto S, Rai MF, Gill CS, Zhang Z, Sandell LJ, Clohisy JC: **Molecular characterization of articular cartilage from young adults with femoroacetabular impingement.** *J Bone Joint Surg Am* 2013, **95**(16):1457-1464.
292. Wuyts A, Struyf S, Gijsbers K, Schutyser E, Put W, Conings R, Lenaerts JP, Geboes K, Opdenakker G, Menten P *et al*: **The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1beta and is down-regulated by interferon-gamma: comparison with interleukin-8/CXCL8.** *Lab Invest* 2003, **83**(1):23-34.
293. De Ceuninck F, Dassencourt L, Anract P: **The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **323**(3):960-969.
294. Sherwood J, Bertrand J, Nalesso G, Poulet B, Pitsillides A, Brandolini L, Karystinou A, De Bari C, Luyten FP, Pitzalis C *et al*: **A homeostatic function of CXCR2 signalling in articular cartilage.** *Ann Rheum Dis* 2014.
295. Malfait AM: **Osteoarthritis year in review 2015: biology.** *Osteoarthritis Cartilage* 2016, **24**(1):21-26.
296. Li NG, Shi ZH, Tang YP, Wang ZJ, Song SL, Qian LH, Qian DW, Duan JA: **New hope for the treatment of osteoarthritis through selective inhibition of MMP-13.** *Curr Med Chem* 2011, **18**(7):977-1001.
297. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T *et al*: **Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice.** *J Clin Invest* 2001, **107**(1):35-44.
298. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW: **Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3723-3733.
299. Liu Y, Hou R, Yin R, Yin W: **Correlation of bone morphogenetic protein-2 levels in serum and synovial fluid with disease severity of knee osteoarthritis.** *Med Sci Monit* 2015, **21**:363-370.
300. Davidson EN, Vitters EL, Bennink MB, van Lent PL, van Caam AP, Blom AB, van den Berg WB, van de Loo FA, van der Kraan PM: **Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage.** *Ann Rheum Dis* 2015, **74**(6):1257-1264.
301. Huang KY, Yan JJ, Hsieh CC, Chang MS, Lin RM: **The in vivo biological effects of intradiscal recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the injured intervertebral disc: an animal experiment.** *Spine (Phila Pa 1976)* 2007, **32**(11):1174-1180.
302. Caron MM, Emans PJ, Cremers A, Surtel DA, Coolsen MM, van Rhijn LW, Welting TJ: **Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(4):604-613.

303. Henrotin Y, Pesesse L, Lambert C: **Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis.** *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2014, **6**(1):20-34.
304. Pesesse L, Sanchez C, Delcour JP, Bellahcene A, Baudouin C, Msika P, Henrotin Y: **Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(12):1913-1923.
305. Lambert C, Dubuc JE, Montell E, Verges J, Munaut C, Noel A, Henrotin Y: **Gene expression pattern of synovial cells from inflammatory and normal areas of osteoarthritis synovial membrane.** *Arthritis Rheum* 2013.
306. He LF, Wang TT, Gao QY, Zhao GF, Huang YH, Yu LK, Hou YY: **Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells.** *J Biomed Sci* 2011, **18**:39.
307. Yeung BH, Law AY, Wong CK: **Evolution and roles of stanniocalcin.** *Mol Cell Endocrinol* 2012, **349**(2):272-280.
308. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martinez JA, Marti A: **Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases.** *FASEB J* 2015, **29**(9):3595-3611.
309. Wu J, Strawn TL, Luo M, Wang L, Li R, Ren M, Xia J, Zhang Z, Ma W, Luo T *et al*: **Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2-alphaVbeta3 integrin cross talk.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015, **35**(1):111-120.
310. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W *et al*: **Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions.** *Anticancer Res* 2001, **21**(4B):2895-2900.
311. Nakagawa Y, Mukai S, Yamada S, Matsuoka M, Tarumi E, Hashimoto T, Tamura C, Imaizumi A, Nishihira J, Nakamura T: **Short-term effects of highly-bioavailable curcumin for treating knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled prospective study.** *J Orthop Sci* 2014, **19**(6):933-939.
312. Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, Togni S, Appendino G: **Efficacy and safety of Meriva(R), a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients.** *Altern Med Rev* 2010, **15**(4):337-344.
313. Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, Togni S, Appendino G: **Product-evaluation registry of Meriva(R), a curcumin-phosphatidylcholine complex, for the complementary management of osteoarthritis.** *Panminerva Med* 2010, **52**(2 Suppl 1):55-62.
314. Gillette RL, Angle TC: **Recent developments in canine locomotor analysis: a review.** *Vet J* 2008, **178**(2):165-176.
315. Moreau M, Lussier B, Ballaz L, Troncy E: **Kinetic measurements of gait for osteoarthritis research in dogs and cats.** *Can Vet J* 2014, **55**(11):1057-1065.
316. Nordquist B, Fischer J, Kim SY, Stover SM, Garcia-Nolen T, Hayashi K, Liu J, Kapatkin AS: **Effects of trial repetition, limb side, intraday and inter-week variation on vertical and craniocaudal ground reaction forces in clinically**

- normal Labrador Retrievers. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011, **24**(6):435-444.
317. Laflamme DP: **Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs.** *Canine Practice July/August 1997*, **22**:10-15.
318. NRC: **Nutrient requirements of dogs and cats.** Washington DC: National Academic Press. In: *Energy*. Edited by Council NR; 2006: 22-48.
319. Bermingham EN, Thomas DG, Cave NJ, Morris PJ, Butterwick RF, German AJ: **Energy requirements of adult dogs: a meta-analysis.** *PLoS One* 2014, **9**(10):e109681.
320. Chaurasia S, Patel RR, Chaubey P, Kumar N, Khan G, Mishra B: **Lipopolysaccharide based oral nanocarriers for the improvement of bioavailability and anticancer efficacy of curcumin.** *Carbohydr Polym* 2015, **130**:9-17.
321. Deberg M, Labasse A, Christgau S, Cloos P, Bang Henriksen D, Chapelle JP, Zegels B, Reginster JY, Henrotin Y: **New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(3):258-265.
322. Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Suwankong N, Ong-Chai S, Kongtawelert P: **The effect of doxycycline on canine hip osteoarthritis: design of a 6-months clinical trial.** *J Vet Sci* 2009, **10**(3):239-247.
323. Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT: **Ability of the canine brief pain inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis.** *J Am Vet Med Assoc* 2008, **233**(8):1278-1283.
324. Brown DC, Boston RC, Farrar JT: **Comparison of force plate gait analysis and owner assessment of pain using the Canine Brief Pain Inventory in dogs with osteoarthritis.** *J Vet Intern Med* 2013, **27**(1):22-30.
325. Madore E, Huneault L, Moreau M, Dupuis J: **Comparison of trot kinetics between dogs with stifle or hip arthrosis.** *Vet Comp Orthop Traumatol* 2007, **20**(2):102-107.
326. Bai JP, Burckart GJ, Mulberg AE: **Literature Review of Gastrointestinal Physiology in the Elderly, in Pediatric Patients, and in Patients with Gastrointestinal Diseases.** *J Pharm Sci* 2015.
327. Henrotin Y, Martel-Pelletier J, Msika P, Guillou GB, Deberg M: **Usefulness of specific OA biomarkers, Coll2-1 and Coll2-1NO2, in the anterior cruciate ligament OA canine model.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2012, **20**(7):787-790.
328. Bay-Jensen AC, Reker D, Kjelgaard-Petersen CF, Mobasheri A, Karsdal MA, Ladel C, Henrotin Y, Thudium CS: **Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria.** *Osteoarthritis Cartilage* 2016, **24**(1):9-20.
329. Henrotin Y, Gharbi M, Dierckxsens Y, Priem F, Marty M, Seidel L, Albert A, Heuse E, Bonnet V, Castermans C: **Decrease of a specific biomarker of collagen degradation in osteoarthritis, Coll2-1, by treatment with highly bioavailable curcumin during an exploratory clinical trial.** *BMC Complement Altern Med* 2014, **14**:159.
330. Matabudul D, Pucaj K, Bolger G, Vcelar B, Majeed M, Helson L: **Tissue distribution of (Lipocurc) liposomal curcumin and tetrahydrocurcumin**

following two- and eight-hour infusions in Beagle dogs. *Anticancer Res* 2012, 32(10):4359-4364.

7 ANNEXES



PATENTSCOPE

Search International and National Patent Collections

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

Machine translation

1. (WO2014184246) JOINT CARE COMPOSITION

PCT Biblio. Data	Description	Claims	National Phase	Notices	Drawings	Documents
Latest bibliographic data on file with the International Bureau						
Pub. No.:	WO/2014/184246	International Application No.:	PCT/EP2014/059850			
Publication Date:	20.11.2014	International Filing Date:	14.05.2014			
IPC:	A61K 36/82 (2006.01), A61K 31/05 (2006.01), A61K 31/353 (2006.01), A61K 38/00 (2006.01), A61K 45/06 (2006.01), A61P 19/02 (2006.01)					
Applicants:	MARS, INCORPORATED [US/US]; 6885 Elm Street McLean, VA 22101 (US). MARS PETCARE UK [GB/GB]; 3D Dundee Road Slough Berkshire SL1 4LG (GB) (TT only)					
Inventors:	SERISIER, Samuel; (FR). COMBLAIN, Fanny; (FR). HENROTIN, Yves; (FR)					
Agent:	CORNISH, Kristina, Victoria, Joy; Kilburn & Strode LLP 20 Red Lion Street London Greater London WC1R 4PJ (GB)					
Priority Data:	13305609.3 14.05.2013 EP 13305615.0 15.05.2013 EP					
Title	(EN) JOINT CARE COMPOSITION (FR) COMPOSITION DE SOIN DES ARTICULATIONS					
Abstract:	<p>(EN)The present invention relates to a composition comprising curcuminoid with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline for use in preventing or treating osteoarthritis. It also relates to a method of preventing or treating osteoarthritis in mammals, the method comprising administering to said mammal a composition which comprises curcuminoid with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline.</p> <p>(FR)L'invention concerne une composition comprenant un curcumoïde avec un polyphénol de thé vert ou avec une association de glycine, de proline et d'hydroxyproline, utilisée pour prévenir ou traiter l'arthrose. L'invention concerne également un procédé permettant de prévenir ou de traiter l'arthrose chez le mammifère, ledit procédé consistant à administrer audit mammifère une composition comprenant un curcumoïde avec un polyphénol de thé vert ou avec une association de glycine, de proline et d'hydroxyproline.</p>					
Designated States:	AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW. Organisation régionale africaine de la propriété intellectuelle (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Office eurasiatique des brevets (OEAB) (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM) Office européen des brevets (OEB) (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR) Organisation africaine de la propriété intellectuelle (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).					
Publication Language:	anglais (EN)					
Filing Language:	anglais (EN)					



1. (WO2014184246) JOINT CARE COMPOSITION

PCT Biblio. Data Description Claims National Phase Notices Drawings Documents

Note: Text based on automatic Optical Character Recognition processes. Please use the PDF version for legal matters

JOINT CARE COMPOSITION

The present invention relates to a composition comprising curcuminoid with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline for use in preventing or treating osteoarthritis. It also relates to a method of preventing or treating osteoarthritis in mammals, the method comprising administering to said mammal a composition which comprises curcuminoid with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline.

Cartilage deterioration can be caused by several reasons such as repeated exercise, instability of the joint, etc., which may result in inflammation of the joints. While a greater portion of humans with arthritis have rheumatoid arthritis, most of the arthritis occurring in companion animals is osteoarthritis.

Nowadays, no cure exists for osteoarthritis, and the pharmacological treatment is limited to alleviating symptoms. The most popular are non-steroidal anti-inflammatory drugs, but these are associated with adverse effects. A safer treatment is desirable.

The first aspect of this invention relates to a composition comprising curcuminoid with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline for use in preventing or treating osteoarthritis. Treating osteoarthritis includes ameliorating osteoarthritis symptoms.

The present invention relates, for all aspects, to any mammal, including a human. In particular, the present invention relates to a companion animal such as a dog, a cat or an equine animal (e.g. a horse) or any other such animal that suffers or is prone to suffer from osteoarthritis.

The composition of the present invention comprises curcuminoid. Curcuminoid is curcumin or a derivative of curcumin. The chemical structures of curcuminoids differ in their functional groups.

Curcuminoid includes curcumin, demethoxycurcumin, b/s-methoxycurcumin and/or tetrahydrocurcumin.

Curcuminoids are natural phenols that are present, in particular, in the Indian spice turmeric. Turmeric is derived from the roots of the plant *Curcuma longa*. Curcuminoids have also been found in roots of other species in the plant family Zingiberaceae of the *Curcuma* genus. Curcuminoids have a distinctly earthy, bitter, peppery flavour and a mustardy smell.

In particular, turmeric contains 60-80% curcumin, 15-30% demethoxycurcumin and 2-6% b/s-demethoxycurcumin.

The curcuminoid in the composition of the invention can be of any format, including a powder or lipid extract.

In some embodiments, curcuminoid can be mixed with phospholipids and/or cellulose, starch or derivatives thereof to form complexes. This may assist in stability and/or to further increase solubility and bioavailability of the curcuminoid.

The curcuminoid can be mixed with essential oils, piperine or bromelain. The curcuminoid can be mixed with phosphatidylcholine, for example lecithin.

Preferably, the curcuminoid of the present invention is curcumin, which is the most active curcuminoid. Curcumin according to the present invention includes demethoxycurcumin, b/s-demethoxycurcumin and/or tetrahydrocurcumin.

The composition of the invention comprises curcuminoid and green tea polyphenol.

Tea (*Camellia sinensis*), in particular green tea, has a high content of flavonoids, including polyphenols, in particular catechins. Catechins in tea include epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epicatechin (EC), epicatechin-3-gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), catechin, and galocatechin (GC).

Preferably, the green tea polyphenols include catechin. Preferably, the catechin includes EGCG. Green tea extract usually contains at least about 25% polyphenols, about 12.5% of catechins and about 9.3% of EGCG.

Epigallocatechin gallate (EGCG) is the ester of epigallocatechin and gallic acid. EGCG is the most abundant catechin in tea and is a potent antioxidant. It is particularly found in green tea. EGCG is a major polyphenol of green tea and exhibits anti-oxidant, anti-tumour and anti-mutagenic activities.

The composition of the invention comprises curcumin and a combination of glycine, proline and hydroxyproline.

A combination of glycine, proline and hydroxyproline represents 50% of the total amino acid content of hydrolyzed collagen. Preferably, a combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen. The amino acid composition of hydrolyzed collagen is as set in the table below;

Table 1

Amino acids	Percentage
Proline/Hydroxyproline	25%
Glycine	20%
Glutamic acid	11%
Arginine	8%
Alanine	8%
Other essential amino acids	16%
Other non-essential amino acids	12%

Hydrolyzed collagen is obtained by the enzymatic hydrolysis of collagenous tissues found in the bones, skin, and connective tissue of animals such as cattle, fish, horses, pigs, and rabbits. Hydrolyzed collagen is well digested and is preferentially accumulated in cartilage.

EP2014059850 JOINT CARE COMPOSITION

A preferred composition includes curcuminoid, green tea polyphenol and a combination of glycine, proline and hydroxyproline. Preferably, this composition includes curcumin, green tea polyphenol and hydrolyzed collagen.

The invention is preferably a foodstuff. It can be any foodstuff, such as dry, semi moist or wet food product. In particular, the foodstuff may be a pet food product.

The pet foodstuff is preferably a commercial pet food product. Such a product is preferably sold as a product for feeding to a pet animal, in particular a pet cat or a pet dog.

A typical pet foodstuff contains about 20-30% crude protein and about 10-20% fat, the remainder being carbohydrate, including dietary fibre and ash. A typical wet or moist product contains (on a dry matter basis) about 40% fat, 50% protein and the remainder being fibre and ash. The foodstuff of the invention may be a dry product (with approximately 5 to approximately 15% moisture), a semi-moist product (with approximately 15 to approximately 70% moisture) or a wet product (with approximately 70 to approximately 90% moisture).

The remaining components of the foodstuff are not essential to the invention and typical standard products can be included. The combined ingredients of the foodstuff according to the invention can provide all of the recommended vitamins and minerals for the particular animal in question (a complete and balanced food).

The foodstuff according to the present invention encompasses any product which a pet consumes in its diet. Thus, the invention covers standard food products including liquids, as well as pet food snacks (for example, snack bars, pet chew, crunchy treat, cereal bars, snacks, biscuits and sweet products) and supplements.

The foodstuff can be provided as a food supplement. The food supplement can be a powder, sauce, topping, biscuit, kibble, pocket or tablet that can be administered with or without an additional foodstuff. Where the food supplement is administered with an additional foodstuff, the food supplement can be administered sequentially simultaneously or separately. The food supplement may be mixed with the foodstuff, sprinkled over the foodstuff or served separately. Alternatively, the food supplement can be added to a liquid provided for drinking such as water or milk.

The foodstuff is preferably a cooked product. It may incorporate meat or animal derived material (such as beef, chicken, turkey, lamb, fish, blood plasma, marrow bone etc. or one or more thereof). The product alternatively may be meat free (preferably including a meat substitute such as soya, maize gluten or a soya product) in order to provide a protein source. The foodstuff may contain additional protein sources such as soya protein concentrate, milk proteins, gluten etc. The foodstuff may also contain a starch source such as one or more grains (e.g. wheat, corn, rice, oats, barley etc.), or may be starch free.

The foodstuff of the invention is preferably produced as a dry product containing from approximately 5% to approximately 15% moisture. The preferred dry food is more preferably presented as a small biscuit-like kibbles.

The table below details the amount of the composition according to the present invention and the amount of the composition for the dogs to take according to the present invention:

Table 2 Diet 1 Diet 2 Diet 3 Energy need (kcal/kg^{0.75})

3515	2500	5600	80	95	145	kcal	kcal	kcal
%DM	%DM	%DM	mg/400	mg/400	mg/400	kcal	kcal	kcal
Curcuma	0,171	0,07	0,32	210	175	102		
(turmeric) extract								
Curcuminoids	0,034	0,013	0,065	43	35	22		
Curcumin	0,026	0,01	0,05	33	27	15		
Green tea extract	0,341	0,155	0,63	414	349	225		
Green tea poly	0,085	0,035	0,16	106	87	51		
Green tea EGCG	0,032	0,01	0,06	39	32	15		
Collagen	1,706	0,7	3,2	2108	1747	1016	hydrolyzed	
Glycine	1,158	0,53	2,15	1416	1	185	767	
Proline	1,358	0,63	2,5	1651	1390	91	1	
Hydroxyproline	0,177	0,08	0,33	217	182	1	16	
Total	2,693	1,2	5	3295	2757	1736	gly+pro+hydroxypro	

The composition in the first aspect of the invention may comprise curcuminoid at an amount ranging from about 0.005 to 1.1 % by weight of curcuminoid on an "as is" weight percent of the food. The amount of curcuminoid can be any amount from 0.005 to 1.1 % (as is). The amount of curcuminoid can be any amount from 0.1 to 1 % (as is). The amount of curcuminoid can be any amount from 0.1 to 0.6% (as is). The amount of curcuminoid can be any amount from 0.3 to 0.6% (as is).

The composition in the first aspect of the invention may comprise curcuminoid at an amount ranging from about 0.005 to 0.15% by weight of curcuminoid on an "as is" weight percent of the food. The amount of curcuminoid can be any amount from 0.005 to 0.15% (as is) (7 to 99 mg/400 kcal).

When the diet is dry the "as is" weight is the same as the "dry matter weight".

Preferably, the amount of curcuminoid in the composition ranges from about 0.01 to 0.07% (as is) (14 to 46 mg/400 kcal). Most preferably, the amount of curcuminoid is 0.035% (as is) (36 mg/400 kcal).

In some embodiments, the curcuminoid in the composition is curcumin at an amount ranging from about 0.005 to 0.15% by weight of curcumin on an "as is" weight percent of the food. The amount of curcumin can be any amount from 0.005 to 0.15% (as is) (7 to 99 mg/400 kcal). Preferably, the amount of curcumin ranges from about 0.01 to 0.05% (as is) (14 to 32 mg/400 kcal). Most preferably, the amount of curcumin is 0.026% (as is) (27 mg/400 kcal).

The composition in the first aspect of the invention may comprise green tea polyphenol in an amount ranging from about 0.01 to 1.1 % by weight of green tea polyphenol on an "as is" weight percent of the food. The amount of green tea polyphenol can be any amount from 0.01 to 1.1 % (as is). The amount of green tea polyphenol can be any amount from 0.1 to 1 % (as is). The amount of green tea polyphenol can be any amount from 0.1 to 0.6% (as is). The amount of green tea polyphenol can be any amount from 0.3 to 0.6% (as is).

The composition in the first aspect of the invention may comprise green tea polyphenol in an amount ranging from about 0.01 to 0.3 % by weight of green tea polyphenol on an "as is" weight percent of the food. The amount of green tea polyphenol can be any amount from 0.01 to 0.3 % (as is) (14 to 197 mg/400 kcal). Preferably, the amount of green tea polyphenol ranges from about 0.03 to 0.17% (as is) (43 to 113 mg/400 kcal). Most preferably, the amount of green tea polyphenol is 0.085% (as is) (87 mg/400 kcal).

In some embodiments, the green tea polyphenol is EGCG at an amount ranging from about 0.005 to 0.2% by weight of EGCG on an "as is" weight percent of the food (7 to 131 mg/400 kcal). The amount of EGCG can be any amount from 0.01 to 0.06% (as is) (14 to 39 mg/400 kcal). Most preferably, the amount of EGCG is 0.032% (as is) (33 mg/400 kcal).

The composition in the first aspect of the invention may comprise a combination of glycine, proline and hydroxyproline in an amount ranging from about 0.5 to 10% by weight of combined glycine, proline and hydroxyproline on an "as is" weight percent of the food. The amount of combined glycine, proline and hydroxyproline can be any amount from 0.5 to 10% (as is) (720 to 6591 mg/400 kcal). Preferably, the amount of combined glycine, proline and hydroxyproline ranges from about 1.2 to 5% (as is) (1736 to 3295 mg/400 kcal). Most preferably, the amount of combined glycine, proline and hydroxyproline is 2.7% (as is) (2780 mg/400 kcal).

In some embodiment, the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen in an amount ranging from about 0.5 to 5% by weight of combined glycine, proline and hydroxyproline on an "as is" weight percent of the food. The amount of hydrolyzed collagen can be any amount from 0.5 to 5% (as is)

EP2014059850 JOINT CARE COMPOSITION

(720 to 3295 mg/400 kcal). Preferably, the amount of hydrolyzed collagen ranges from about 0.7 to 3.2% (as is) (1016 to 2138 mg/400 kcal). Most preferably, the amount of hydrolyzed collagen is 1.7% (as is) (1750 mg/400 kcal).

In other embodiments, the composition may comprise curcumin in an amount of about 27 mg/400 kcal (35 mg/400 kcal of curcuminoids) with about 87 mg/400 kcal of green tea polyphenol and with about 2757 mg/400 kcal of combined glycine, proline and hydroxyproline, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen. Preferably, wherein the combination of glycine, proline and

hydroxyproline is hydrolyzed collagen and is present in the composition at an amount of about 1747mg/400kcal.

In other embodiments, the composition may comprise curcumin in an amount of about 33 mg/400 kcal (43mg/400 kcal of curcuminoids) with about 106 mg/400 kcal of green tea polyphenol and with about 3295 mg/400 kcal of combined glycine, proline and hydroxyproline, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen. Preferably, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen and is present in the composition at an amount of about 2108mg/400kcal.

In other embodiments, the composition may comprise curcumin in an amount of about 15 mg/400 kcal (22mg/400 kcal of curcuminoids) with about 51 mg/400 kcal of green tea polyphenol and with about 1736 mg/400 kcal of combined glycine, proline and hydroxyproline, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen. Preferably, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen and is present in the composition at an amount of about 1016mg/400kcal.

These values apply to a composition for feeding to a mammal, in particular a companion animal.

The second aspect of the invention relates to a method of preventing or treating osteoarthritis in mammals.

Osteoarthritis (OA) is a degenerative and inflammatory condition that affects the joints in mammals. It is also known as degenerative arthritis or degenerative joint disease. Osteoarthritis is a group of abnormalities involving degradation of joints, including articular cartilage and sub-chondral bone.

Osteoarthritis is the consequence of an imbalance of catabolism and anabolism, wherein catabolism is increased; anabolism is decreased causing the inflammation of chondrocytes. Chondrocytes are the only cells found in healthy cartilage. They produce and maintain the cartilaginous matrix, which consists mainly of collagen and proteoglycans. The composition of the invention has demonstrated to provide, inter alia, a decrease in inflammation, a decrease in catabolism and an increase in anabolism in in

vitro inflammation-induced chondrocytes and in vitro healthy chondrocytes. Thus, the composition of the invention prevents and/or treats osteoarthritis in animals.

The present invention relates, for all aspects, to any mammal, including a human. In particular the present invention relates to a companion animal such as a dog, a cat or an equine animal (e.g. a horse) or any other such animal that suffers or is prone to suffer from osteoarthritis.

In particular, it is a desire in the area of pet foodstuff and companion animal health to provide foodstuff including supplements suitable to support the health of the companion animals. In particular, it is desire to provide diets suitable to promote or maintain the health of already healthy companion animals.

In particular, the second aspect of the invention provides a method for preventing and treating osteoarthritis in mammals, including ameliorating the symptoms of osteoarthritis, in particular companion animals. The method comprises administering to said animal a composition which comprises curcumin with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline. The animal may be in need thereof. Since a significant number of dogs suffer from osteoarthritis in their lifetime, all dogs can be considered as in need of prevention.

In particular embodiments, the method comprises administering to said animal a composition comprising curcumin, green tea polyphenol and a combination of glycine, proline and hydroxyproline. Most preferably, the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolysed collagen.

Further, the method is preferably administered to an animal, in particular a companion animal, that suffers from osteoarthritis and is in need of ameliorating the symptoms of osteoarthritis or in need of preventing further symptoms of osteoarthritis or in need of treatment of osteoarthritis. This may be to, for example a young pet animal, such as a puppy, or an older companion animal. Where the composition is a foodstuff, the foodstuff may be administered in a dietary regime in accordance with the usual dietary regime of the companion animal. The foodstuff may comprise 100% of the diet of the companion animal or a lesser proportion, depending on the level of prevention or treatment required. The foodstuff allows the composition to be administered with ease thus avoiding a need to supplement the companion animal's food. In addition, the foodstuff can be administered by the animal's owner thus avoiding constant veterinary supervision. The foodstuff may be available at any outlet selling pet food products or may be available from a veterinarian. The foodstuff may be as described above according to the first aspect of the invention.

As used herein, the term "administration" also includes feeding or any other method of oral administration. Other means of administration may include tablets, capsules, injection, suppositories or any other suitable means.

Preferred features for the second aspect of the invention apply as for the first aspect mutatis mutandis.

The present description includes a method for preparing the composition of the first aspect of the invention.

The foodstuff can be made according to any method known in the art such as in Waltham Book of Dog and Cat Nutrition, Ed. ATB Edney, Chapter by A. Rainbird, entitled "A Balanced Diet" in pages 57 to 74 Pergamon Press Oxford.

For example, a process for the manufacture of a foodstuff as defined herein comprises mixing together ingredients with the composition comprising curcuminoid with green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline and forming a foodstuff, in particular a pet foodstuff. Heating/cooking may be applied to any one or more of the ingredients prior to, during or following the mixing.

The composition can be sprayed onto the foodstuff, mixed in with the foodstuff or incorporated into the foodstuff in a matrix. Methods of inclusion of the composition are known in the art.

The importance of the present invention is the beneficial properties of curcuminoid with either green tea polyphenol or with a combination of glycine, proline and hydroxyproline (optionally as hydrolyzed collagen). In particular, an effect which is more than the cumulative effect is seen.

A further benefit is seen with the triple combination of ingredients of: curcuminoid, green tea polyphenol and glycine, proline and hydroxyproline (optionally as hydrolyzed collagen).

The combination of the compounds of the composition of the present invention can provide a synergistic effect in terms of one or more of decreasing inflammation, decreasing catabolism and increasing anabolism.

The invention will now be further described by way of reference to the following Examples, which are provided for the purpose of illustration only and are not to be construed as being limiting on the invention.

Example 1 : Individual screening of compounds

Experiments were carried out to assess the effect of several compounds on primary culture of bovine chondrocytes, in which inflammatory and catabolic processes are induced by interleukin-1 beta to mimic the effect of arthritic chondrocytes.

The table below details the biomarkers that were measured throughout the experiments to show the effect of the compounds of the three metabolic pathways on chondrocytes.

Table 3: Biomarkers tested

EP2014059850 JOINT CARE COMPOSITION

Biomarkers produced by chondrocytes	Inflammation	NO
		PGE2
		IL-6
		COX2
Genes expressed by chondrocytes	Catabolism	INOS
		MMP3
		ADAMTS4
	Anabolism	ADAMTS5
		COL2
		AGG

Primary culture of bovine chondrocytes in monolayer

Normal bovine articular cartilage was obtained from the metacarpal-phalangeal joint of 1 to 2 year old steers shortly after death. Full-depth articular cartilage was excised and immersed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (with phenol red and 4.5 g/L glucose) supplemented with N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

(HEPES) 10 mM, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) (all from Lonza, Verviers, Belgium). After three washings, chondrocytes were released from cartilage by sequential enzymatic digestions with 0.5 mg/ml hyaluronidase type IV S (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) for 30 min at 37 °C, 1 mg/ml pronase E (Merck, Leuven, Belgium) for 1 h at 37 °C and 0.5 mg/ml clostridial collagenase IA (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) for 16 to 20 h at 37 °C. The enzymatically isolated cells were then filtered through a nylon mesh (70 µm), washed three times, counted and filled to the density of 0.25 x 10⁶ cells/ml of DMEM (with phenol red and 4.5 g/L glucose) supplemented with 10 % foetal bovine serum, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine (all from Lonza, Verviers, Belgium) and 20 µg/ml proline (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium). Cells were seeded in a 6-well plate at 0.5 X 10⁶ cells/well by adding 2 ml of the previously described culture medium/well and cultured in monolayer for 5 days. Chondrocytes were then cultured in monolayer until confluence (for about 2 days) in DMEM (phenol red-free and containing only 1 g/L glucose) (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 1 % fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 20 µg/ml proline. Only primary cultures were used to ensure the stability of chondrocyte phenotype.

When cells achieved confluence, the culture medium was removed and replaced by fresh culture medium (DMEM phenol red-free and containing only 1 g/L glucose supplemented with 1 % fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 20 µg/ml proline) containing some nutraceuticals (12.5 µg/ml of each of them) and in the absence or in the presence of recombinant porcine I L-1 β (10⁻¹¹ M) (RD System, Abingdon, UK).

The anti-inflammatory power of the compounds (firstly individually and then in combination) was tested by measuring the chondrocyte viability and the production of PGE2 and NO.

The compounds were added in the culture medium either before inflammation (prevention effect measurement), either simultaneously of the inflammation (treatment effect measurement).

List of compounds screened:

- 1) Fish oil: 18%EPA+10%DHA (DSM)
- 2) EPA 99% (Sigma):
- 3) DHA 99% (Sigma):
- 4) Aloe Vera (Naturex)
- 5) Nettle leaf extract (Naturex)
- 6) Resvida: 99% Resveratrol (DSM)
- 7) Green tea extract: 25% polyphenols of which 12.5 % are catechines and 8% is EGCG: (Naturex)
- 8) Pine bark extract: Pycnogenol: 65-75% procyanidines (Biolandes)
- 9) Premix of vitamins including vitamin D3
- 10) GLM (AromaNZ)
- 11) collagen hydrolysate (Fortigel de Gelita [3,3kDa]: hydrolyzed pork collagen)
- 12) ASU (Sochim)
- 13) Curcuma powder : 85% curcuminoids (Naturex)

The results showed the 3 compounds to use were curcuma extract, hydrolysate collagen and green tea extract, which showed significant effects on different parameters. After that, these 3 compounds were tested in response-dose.

Example 2: Dose responses

The methodology of example 1 was followed. Four different concentrations were tested to cover the range of concentrations corresponding to 10⁻⁵ M, depending on the molecular weight: 0.5 µg ml, 2.5 µg ml, 12.5 µg ml and 62.5 µg ml.

The results showed that the concentration which gave the best effects without giving toxic effects was 12^µg/ml for each compound. This is why the concentration of 12^µg/ml was used for testing compounds in combination with each other.

Example 3: Testing particular combinations of the compounds and the synergistic effects

The method of example 1 was followed.

Supplementation with compounds

When cells achieved confluence, the culture medium was removed and replaced by fresh culture medium (DMEM phenol red-free and containing only 1 g/L glucose supplemented with 1 % fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 20 µg ml proline) containing some compounds (12.5 µg ml of each of

them) and in the absence or in the presence of recombinant porcine I L-1 β (10⁻¹¹ M) (RD System, Abingdon, UK).

The three compounds were tested namely, curcuma extract (Naturex, Avignon, France), hydrolysate collagen (Gelita, Eberbach, Germany) and green tea extract (Naturex, Avignon, France). Curcuma extract was prepared as a 12.5 mg/ml solution in tetrahydrofuran (Merck, Leuven, Belgium) and then further diluted 1000 times in cell culture medium. Hydrolysate collagen and green tea extract were dissolved in water at the concentration of 12.5 mg/ml, filtered through a sterile mesh (0.2

µm)

hydrolysate collagen + 12.5 µg/ml green tea extract) in the absence or in the presence of recombinant porcine I L-1 β (10⁻¹¹ M). The effects of the compounds were compared to controls: DMEM alone or DMEM + I L-1 β.

EP2014059850 JOINT CARE COMPOSITION

Culture stop

After 24 h in these conditions, conditioned culture medium of three wells of each condition was collected and stored at -20°C. The cells of these corresponding wells were scrapped, an RNA extraction was made using RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), a reverse transcriptase polymerase chain reaction was realised and then a quantitative real time polymerase chain reaction was realised, using the LightCycler 480 (Roche, Vilvoorde, Belgium) to analyse gene expression.

After 48 h in these conditions, conditioned culture medium of the remaining wells (3 of each condition) was collected (lactate dehydrogenase release assay) and stored at -20°C until analysis (nitrite and prostaglandin E2 assays). Cells were scrapped and homogenized in 500 µl of Tris-HCl buffer by ultrasonic dissociation for 20 s at 4 °C, to measure DNA content.

Lactate dehydrogenase release assay

Cell viability was estimated by quantifying the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture supernatant. A 100 µl sample of the supernatant or dilutions of standard solution (LDH from rabbit muscle) was mixed with 50 µl of Tris buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 % bovine serum albumin) containing 800 mM lactate. Then, 50 µl of colorimetric reagent, 1.6 mg/ml iodinitrotetrazolium chloride (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium), 4 mg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (Roche Diagnostics, Brussels, Belgium), and 0.4 mg/ml phenazine methosulfate (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) were added, and the absorbance at 492 nm was read after 10 min of incubation at room temperature.

DNA assay

Chondrocytes were homogenized in 500 µl of Tris-HCl buffer by ultrasonic dissociation for 15 s at 4 °C. DNA content was measured in the cell extracts using the fluorimetric method of Hoechst.

Nitrite assay

Nitric oxide (NO) production was determined by quantifying its derived product, nitrite, in the culture supernatant using a spectrophotometric method based upon the Griess reaction. Briefly, 100 µl of the supernatant or sodium nitrite (NaNO2) standard dilutions were mixed with 100 µl of Griess reagent (0.5 % sulphanilamide, 0.05 % naphthyl ethylene diamine dihydrochloride, 2.5 % H3PO4). The absorption was measured at 540 nm. The production of NO was expressed per microgram of DNA.

PGE2 assay

Prostaglandin E2 (PGE2) production was measured in the culture supernatant using the DetectX PGE2 High Sensitivity Immunoassay kit (Arbor Assays, Michigan, USA). Briefly, 100 µl of the supernatant or PGE2 standard dilutions were pipetted into a clear microtiter plate coated with an antibody to capture mouse IgG. A PGE2-peroxidase conjugate (25 µl) is added to the standards and supernatants in the wells. The binding reaction is initiated by the addition of 25 µl of a monoclonal antibody to PGE2. After an overnight incubation at 4°C, the plate is washed and 100 µl of substrate is added. The substrate reacts with the bound PGE2-peroxidase conjugate. After a short incubation, the reaction is stopped and the intensity of the generated colour is detected at 450 nm wavelength. The production of PGE2 was expressed per microgram of DNA.

Quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT PCR)

RNA from cells from 3 wells of each condition was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Then, RNA was reverse transcribed. Quantitative real time

Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed by using the SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Westburg, Leusden, Netherlands). The PCR template source was either first-strand cDNA or purified DNA standard. Primer sequences used to amplify the desired cDNA were as follows: bovine HPRT forward and reverse primers: 5'-AGTTTGAAATACCTGGCG-3' and 5'-AGCTTTAGGCTCGTAGTGC-3'; bovine interleukin (IL)-6 forward and reverse primers: 5'-TGGTGATGACTTCTGCTTTCC-3' and 5'-TGCCAGTGTCTCTTGC-3'; bovine cyclooxygenase (COX)2 forward and reverse primers: 5'-GTCTGATGATGATGACCACC-3' and 5'-AGTAGTCTTCAATCACAAATCT-3'; bovine induced nitric oxide synthase (iNOS) forward and reverse primers: 5'-GGCAAGCACCACATTGACA-3' and 5'-TCCGGCTGGATTTCGGA-3'; bovine aggrecans (AGG) forward and reverse primers: 5'-TGCCTTTGACGTGAGC-3' and 5'-GCATTGTTGTTGACAAACT-3'; bovine type II collagen (COL2) forward and reverse primers: 5'-CTGCGTCTACCCCAAC-3' and 5'-GGGTGCAATGTCAATGAT-3'; bovine metalloproteinase (MMP)-3 forward and reverse primers: 5'-TCTAT G AAG G AG AAG CTG AC AT AAT-3' and 5'-TT C ATG G G C AG C AAC AAG-3' ; bovine A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) 4 forward and reverse primers: 5'-CTTTCATGTCCACAGGC-3' and 5'-CAGGAACGGAAGCGGGTA-3'; bovine ADAMTS 5 forward and reverse primers: 5'-GACACCTGGGAATGGCA-3' and 5'-C AC AG AACTT G G AAT C GT C A-3'.

Amplification was performed with a spectrofluorometric thermal cycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium). To standardize mRNA levels, we amplified HPRT, a housekeeping gene, as an internal control. Gene expression was normalized by calculating the ratio between the number of cDNA copies of IL-6, COX2, iNOS, AGG, COL2, MMP-3, ADAMTS4, ADAMTS5, and that of HPRT.

Results were expressed as the mean percentage of increase compared to the control. Statistical significance was assessed using the t-test. Differences were considered statistically significant at p < 0.05. Table below details the results provided when combining the compounds and the synergistic effects observed.

Table 4

		Control	Curcumin (=C)	Hydrolyzed collagen (=O)	Green tea (=T)	GO	GT	GOT	
Chondrocyte produced biomarkers	Inflammation	NO	0	0	0	0	0	0	
		NO+IL1B	100	-95*	23**	-14*	-100***	-100*	-100***
		PGE2	0	0	0	0	0	0	0
		PGE2+ IL1B	100	-99*	1**	363**	-100*	-100***	-100***
Genes expressed by chondrocytes	Catabolism	IL-6	100	-82*	307**	252**	-43*	-38*	-65*
		IL-6+IL1B	100	-84*	-1*	-5*	-88*	-100*	-98*
		COX2	100	49**	54**	86**	378**	84**	27**
		COX2+IL1B	100	-51*	-24*	-26*	-58*	-87*	-92*
		iNOS	100	-76*	123**	207**	-65***	-27***	-25***
		iNOS+IL1B	100	-86*	-13*	15**	-91*	-96*	-97*
	Anabolism	MMP3	100	40**	108**	161**	91*	-10***	-15***
		MMP3+IL1B	100	-58*	-20*	-22*	-85*	-98*	-98*
		ADAMTS4	100	-21*	12**	9**	16**	-14*	-58***
		ADAMTS4 + IL1B	100	-55*	-23*	-28*	-68*	-83*	-84*
		ADAMTS5	100	-16*	2**	32**	-31***	-26***	-41***
	Anabolism	ADAMTS5+ IL1B	100	-47*	-13*	22**	-52*	-76***	-71***
		COL2	100	-77**	13*	18*	-54**	-62**	-74**
		COL2+IL1B	100	-57**	-2**	55*	-67**	29***	67***
		AGG	100	-77**	54*	33*	-78**	-30**	-53**
AGG+ IL1B	100	-77**	-4**	123*	-82**	186***	337***		

Discussion

EP2014059850 JOINT CARE COMPOSITION

The results of the combinations were better than the additive effect of each compound. An explanation is that because compounds act on different metabolic ways which are related, when there is inflammation, catabolism increases and anabolism decreases. Thus, our non-limiting hypothesis is that curcumin inhibits inflammation induced by IL-1 β (and also induced by collagen and green tea). Once the inflammation is inhibited, catabolism decreases and collagen and green tea polyphenols can have their positive effect on anabolism. Given arthrosis is a vicious circle (inflammation induces catabolism which induces inflammation, etc), when catabolism decreases (and anabolism increases), there is a decrease of inflammation and we recover a virtuous circle.

Moreover, in general, in healthy cells there is always a balance between catabolism and anabolism. We saw that the combinations could have positive effects on the metabolism of healthy cells (with no induction of inflammation by IL-1 β). It is very interesting because, in case of arthrosis or before arthrosis, cells which are still in good health can be protected by our combinations.



1. (WO2014184246) JOINT CARE COMPOSITION

PCT Biblio. Data	Description	Claims	National Phase	Notices	Drawings	Documents
<p>Note: Text based on automatic Optical Character Recognition processes. Please use the PDF version for legal matters</p>						
<p>CLAIMS</p>						
<p>1. A composition comprising curcuminoid with green tea polyphenol and with a combination of glycine, proline and hydroxyproline for use in the prevention and/or treatment of osteoarthritis.</p>						
<p>2. A composition for use as claimed in claim 1, wherein the prevention and/or treatment is for a human or a pet companion such as a cat, a dog or a horse.</p>						
<p>3. A composition for use as claimed in any one of claims 1 to 2, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen.</p>						
<p>4. A composition for use as claimed in any one of claims 1 to 3, wherein the curcuminoid is curcumin.</p>						
<p>5. A composition for use as claimed in any one of claims 1 to 4, wherein the composition is in the form of a foodstuff.</p>						
<p>6. A composition for use as claimed in any one of claims 1 to 5, wherein the curcuminoid is present at an amount of about 0.005% to 1.1% on a dry matter basis.</p>						
<p>7. A composition for use as claimed in any of claims 1 to 6, wherein the green tea polyphenol is present at an amount of about 0.01% to 1.1% on a dry matter basis.</p>						
<p>8. A composition for use as claimed in any of claims 1 to 7, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is present at an amount of about 0.5% to 10% on dry matter basis.</p>						
<p>9. A composition for use as claimed in any one of claims 1 to 8, wherein the curcuminoid is curcumin and is present at an amount of about 0.005% to 0.15% on a dry matter basis.</p>						
<p>10. A method of preventing or treating osteoarthritis in a mammal, comprising the step of administering to said mammal a composition comprising curcuminoid with green tea polyphenol and with a combination of glycine, proline and hydroxyproline.</p>						
<p>11. The method of any one of claim 10, wherein the mammal is a human or pet companion such as a cat, a dog or a horse.</p>						
<p>12. The method of any one of claims 10 to 11, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolyzed collagen.</p>						
<p>13. The method of any one of claims 10 to 12, wherein curcuminoid is curcumin.</p>						
<p>14. The method of any one of claims 10 to 13, wherein the composition is in the form of a foodstuff.</p>						
<p>15. The method of any one of claims 10 to 14, wherein the curcuminoid is present at an amount of about 0.005% to 1.1% on a dry matter basis.</p>						
<p>16. The method of any one of claims 10 to 15, wherein the green tea polyphenol is present at an amount of about 0.01% to 1.1% on a dry matter basis.</p>						
<p>17. The method of any one of claims 10 to 16, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is present at an amount of about 0.5% to 10% on a dry matter basis.</p>						
<p>18. The method of any one of claims 10 to 17, wherein the curcuminoid is curcumin and is present at an amount of 0.005% to 0.15% on a dry matter basis.</p>						
<p>19. A composition comprising curcuminoid, green tea polyphenol and a combination of glycine, proline and hydroxyproline.</p>						
<p>20. A composition as claimed in claim 19, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is hydrolysed collagen.</p>						
<p>21. A composition as claimed in claim 19 or claim 20, wherein the curcuminoid is curcumin.</p>						
<p>22. A composition as claimed in any one of claims 19 to 21, wherein the composition is in the form of a foodstuff.</p>						
<p>23. A composition as claimed in any one of claims 19 to 22, wherein the curcuminoid is present at an amount of about 0.005% to 1.1% on a dry matter basis.</p>						
<p>24. A composition as claimed in any one of claims 19 to 23, wherein the green tea polyphenol is present at an amount of about 0.01% to 1.1% on a dry matter basis.</p>						
<p>25. A composition as claimed in any one of claims 19 to 24, wherein the combination of glycine, proline and hydroxyproline is present at an amount of about 0.5% to 10% on dry matter basis.</p>						
<p>26. A composition as claimed in any one of claims 19 to 25, wherein the curcuminoid is curcumin and is present at an amount of about 0.005% to 0.15% on a dry matter basis.</p>						
<p>27. A process for the preparation of a composition as claimed in any one of claims 19 to 26 comprising mixing together the ingredients and optionally presenting the mixture in a form suitable for composition and administration.</p>						
<p>28. A process as claimed in claim 27, wherein the composition is added to the mixture in the form of a spray, coating or in a starch pocket matrix.</p>						
<p>29. A composition as claimed in any one of claims 19 to 26, for use in medicine.</p>						