

Thèse de Doctorat

Elsa Mével

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*

Spécialité : *Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique*

Unité de recherche : *UMR 791*

Soutenue le *4 décembre 2015*

Thèse N° : 34

Utilisation des procyanidines et de l'hydroxytyrosol dans la prévention de l'arthrose

JURY

Rapporteurs:	Francis BERENBAUM , Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Paris Yves HENROTIN , Professeur des Universités, Liège
Examineur:	Yohann WITTRANT , Chargé de Recherche INRA, Clermont-Ferrand
Invités:	Yves MAUGARS , Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Nantes Nelly URBAN , Directrice R&D/Qualité, Cruviers-Lascours
Directeur de Thèse:	Jérôme GUICHEUX , Directeur de Recherche INSERM, Nantes
Co-Directeur:	Laurent BECK , Chargé de Recherche INSERM, Nantes
Encadrant de Thèse:	Christophe MERCERON , Chercheur associé, Nantes

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier très sincèrement :

Jérôme Guicheux, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité malgré un emploi du temps chargé, pour sa grande rigueur scientifique et son humour caustique.

Laurent Beck, mon co-directeur de thèse, pour son encadrement de qualité, son écoute et son aide précieuse.

Christophe Merceron, mon encadrant de thèse, pour sa gentillesse, sa présence malgré la distance ainsi que ses nombreux conseils avisés.

Je tiens également à témoigner ma gratitude aux personnes ayant accepté de juger ce travail :

Francis Berenbaum et **Yves Henrotin**, pour m'avoir fait le grand honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse et pour la qualité de leurs travaux.

Yohann Wittrant, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, pour avoir suivi l'évolution de ce projet dès le début, pour ses conseils et réflexions scientifiques.

Yves Maugars, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury, pour avoir suivi l'évolution de ce projet et pour son implication dans la poursuite de ce projet.

Nelly Urban, pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury, pour sa bienveillance et sa gentillesse durant ces trois ans et demi de thèse.

Je remercie également, la Société **Grap'Sud**, la **Région Languedoc Roussillon** et l'**ANRT** pour leur soutien financier.

Je remercie très chaleureusement toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce travail :

Pierre Weiss, pour son accueil au sein du laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire-U791.

Mélanie Verron, **Carole Gauthier** et **Sophie Salle**, **Caroline Vignes**, **Valérie Pecqueret**, **Aurore Vanpoucke** et **Gilles Souhiard** pour leur efficacité dans la gestion et la logistique du laboratoire ainsi que leur gentillesse.

Martial Masson, pour son aide régulière et pour avoir flatté ma gourmandise tout le long de ma thèse.

Sophie Sourice, **Julie Lesoeur** et **Maëva Dutilleul**, pour leur aide très précieuse en histologie mais aussi pour leur sympathie.

Claire Vinatier, pour ses conseils et son aide chirurgicale.

Olivier Hamel, pour sa disponibilité et sa compétence chirurgicale.

Le centre de recherche et d'investigation préclinique de l'école nationale vétérinaire de Nantes et en particulier **Olivier Gauthier**, **Borhane Fellah**, **Patrice Roy** et **Ingrid Leborgne**.

Jérôme Abadie, pour son aide précieuse dans l'interprétation histologique et sa gentillesse.

Les membres de l'unité de thérapeutique expérimentale de la SFR François Bonamy (faculté de médecine, Nantes) pour leur aide dans la réalisation des expérimentations animales et en particulier **Pierre Monmousseau**.

Le groupe d'études des substances végétales à activité biologique de l'institut de la vigne et du vin de Bordeaux et en particulier **Tristan Richard** et **Stéphanie Krisa** pour m'avoir accueillie une semaine et pour leur aide très précieuse dans l'analyse UPLC-MS.

La plateforme d'imagerie de la SFR François Bonamy et en particulier **Philippe Hulin**, pour sa compétence et ce qu'il m'a transmis depuis le M2.

Paul Pilet pour ses précieux conseils pour tenter de dompter Photoshop.

Sarah Beck-Cormier pour ses conseils avisés en culture cellulaire et en immunofluorescence.

Catherine Levisage, pour le soutien qu'elle a pu m'apporter, ses conseils et sa bonne humeur.

Les collègues du bureau passés et présents : Christophe (à nouveau !), Sophie, Nico, Johann, Pauline, Vincent, Olivier, Boris, les Nina, Pierre Gabriel, Emeline, Maxence, Mickaël, Richard qui ont rendu la cohabitation à 9 (presque) toujours plaisante et conviviale.

Et les autres... Annabelle, Charlotte, Laure, Maude, Cécile, Cyril, Greig, Amadou, Elise, Elodie, Davy, Fahed, Girish.

Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire U791, sans précision pour n'oublier personne, qui contribuent tous à la convivialité et la bonne humeur empreinte de ce lieu.

Je remercie aussi, **les nutras** et « pièces rapportées », en particulier :

Marie-Ève, pour notre micro-colocation et tous les bons et nombreux moments passés toutes les deux.

Jojo, pour son humour, pour sa capacité à me faire découvrir toutes les semaines de nouveaux endroits et nos promenades.

Cécile, pour sa présence et sa gentillesse.

Julien, pour avoir sa capacité à toujours me faire rigoler.

Patrick et **Olivia**, pour leur amitié, leur hospitalité et leur gentillesse.

Mathilde et **Aurélien**, les « chatons », pour leur jovialité et leur bonne humeur.

Et tous les autres : Emilie, Marie la baronne qui arrive à tous nous réunir, Vietou, Floflo, Juliette, Laëti, Valérie, Fred, Maxou, pour votre soutien et votre amitié depuis la rentrée de septembre 2007.

Les morlaisiens, Anne-Laure, Alban, Jess et Juju, pour votre amitié.

Et bien sûr, ma famille :

Mes grandes sœurs, **Sarah** et **Myriam**, merci pour votre soutien, notre complicité, vos commérages et votre présence à tout moment.

Mon beau-frère **Hervé**, pour sa gentillesse et son hospitalité.

Cléa, ma nièce et filleule pour égayer la vie de famille au quotidien avec tes sourires semi-édentés et tes rires.

A **mes mamies** « Guitte » et « Denise ».

A **mes parents**, merci pour votre présence et soutien de tout instant. Merci de me procurer le sentiment que quoi que je fasse vous serez toujours là pour moi. Cette sécurité pleine de tendresse me fait prendre pleinement conscience de l'amour que vous nous portez, même si ce n'est pas quelque chose que l'on se dit chez nous.

Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

“ Que ton aliment soit ta première médecine”

(Hippocrate)

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles :

E. MÉVEL[#], L-E. MONFOULET[#], C. MERCERON, V. COXAM, Y. WITTRANT, L. BECK[§], J. GUICHEUX[§]
Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools.

Drug Discovery Today (2014), Oct;19(10):1649-1658. ([#] premiers auteurs, [§] contribution équivalente).

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, O. HAMEL, Y. WITTRANT, N. URBAN, L. BECK[§], J. GUICHEUX[§]
Procyanidins/hydroxytyrosol mixture and their *in vivo* metabolites exhibit anti-IL-1 β activities: potential application to osteoarthritis treatment.

Article soumis dans Rheumatology (2015). ([§] contribution équivalente)

E. MÉVEL, C. MERCERON, C. VINATIER, M. MASSON, J. LESOEUR, V. HIVERNAUD, O. GAUTHIER, J. ABADIE, G. NOURISSAT, X. HOUARD, N. URBAN, L. BECK[§], J. GUICHEUX[§]

Procyanidins and hydroxytyrosol consumption decreases the severity of post-traumatic osteoarthritis in mice and rabbits preclinical models.

En cours de soumission. ([§] contribution équivalente).

Proceeding:

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, N. URBAN, L. BECK, J. GUICHEUX

The *in vitro* effects of procyanidins and hydroxytyrosol-containing grape and olive extract mix on the inflammation-associated osteoarthritis processes.

Osteoarthritis and Cartilage Vol.22 Supplement April 2014 pp. S323.

Communications: (O: orale; P: Poster)

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, N. URBAN, L. BECK, J. GUICHEUX

Effets d'extraits phénoliques de raisin et d'olive sur des modèles *in vitro* et *ex vivo* d'arthrose induite par l'IL-1 β .

15^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés. 30 mai au 1^{er} juin 2013, Poitiers, France. (O, P) **Prix de la meilleure communication orale.**

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, N. URBAN, L. BECK, J. GUICHEUX

Effets d'extraits phénoliques de raisin et d'olive sur des modèles *in vitro* et *ex vivo* d'arthrose induite par l'IL-1 β .

Journée Scientifiques de l'école doctorale Biologie Santé. 9-10 décembre 2013, Nantes, France. (O)

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, N. URBAN, L. BECK, J. GUICHEUX

The *in vitro* effects of procyanidins and hydroxytyrosol-containing grape and olive extract mix on the inflammation-associated osteoarthritis processes.

OsteoArthritis Research Society (OARSI) World Congress. 24-27 avril 2014, Paris, France. (P)

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, Y. WITTRANT, N. URBAN, L. BECK, J. GUICHEUX

Blocking the inflammation-associated OA processes with procyanidins and hydroxytyrosol-containing grape seed and olive extract mix: application to OA prevention.

16^{èmes} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés. 14-16 mai 2014, Limoges, France. (O)

Prix de la meilleure communication orale.

E. MÉVEL, C. MERCERON, M. MASSON, N. URBAN, L. BECK, J. GUICHEUX

OA prevention using procyanidins and hydroxytyrosol-containing grape seed and olive extract mix.

Réunion distributeurs Grap'Sud. 4 mai 2015, Genève, Suisse. (O)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
AVANT-PROPOS	8
I- ÉTAT DE L'ART	12
1. Le cartilage articulaire : de la physiopathologie au traitement de l'arthrose	13
1.1 L'articulation saine	13
1.1.1 Le cartilage articulaire	14
1.1.1.1 Composition du cartilage articulaire	15
1.1.1.1.1 Les cellules du cartilage : les chondrocytes.....	15
1.1.1.1.2 La matrice extracellulaire (MEC) du cartilage	16
1.1.1.2 Organisation du cartilage articulaire.....	21
1.1.2 Le tissu osseux	22
1.1.2.1 Structure et composition du tissu osseux.....	22
1.1.2.2 Les fonctions du tissu osseux.....	23
1.1.3 La membrane et le liquide synovial.....	23
1.1.4 Les autres structures de l'articulation.....	24
1.2 L'arthrose : maladie de l'articulation	25
1.2.1 Définitions et classification de l'arthrose	25
1.2.2 Prévalence et impact économique de l'arthrose	27
1.2.3 Etiologie de l'arthrose	28
1.2.3.1 Les risques intrinsèques	28
1.2.3.2 Les risques extrinsèques	29
1.2.4 Altérations physiques observées au cours de l'arthrose	30
1.2.5 Modifications moléculaires observées au cours de l'arthrose.....	32
1.2.5.1 Les enzymes de dégradation impliquées dans le catabolisme	32
1.2.5.1.1 Les métalloprotéases (MMPs).....	32
1.2.5.1.2 Les agrécanases	33
1.2.5.1.3 Les cathepsines	33
1.2.5.2 Les médiateurs de l'inflammation.....	34
1.2.5.2.1 Les cytokines	34
1.2.5.2.2 La prostaglandine E ₂	38
1.2.5.2.3 Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO)	39
1.2.5.2.4 Le zinc	40
1.2.5.3 Les facteurs anaboliques du cartilage	40
1.2.5.3.1 L'insulin-like growth factor (IGF)	41
1.2.5.3.2 Le transforming growth factor- β (TGF- β).....	41
1.2.5.3.3 Le tissue inhibitor of MMPs (TIMPs)	41
1.2.6 Prise en charge thérapeutique de l'arthrose	42

1.2.6.1	Non-pharmaceutique	42
1.2.6.2	Pharmaceutique	43
1.2.6.2.1	Les traitements symptomatiques d'action rapide	43
1.2.6.2.1.1	Les antalgiques	43
1.2.6.2.1.2	Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)	46
1.2.6.2.2	Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL).....	46
1.2.6.2.3	Les traitements locaux	50
1.2.6.3	Les traitements chirurgicaux.....	50
1.2.6.4	Les approches innovantes : l'ingénierie tissulaire du cartilage.....	51
1.2.7	Les modèles animaux d'arthrose.....	52
1.2.7.1	Les modèles naturels.....	52
1.2.7.1.1	Les modèles génétiquement modifiés	52
1.2.7.1.2	Les modèles liés à l'âge	52
1.2.7.2	Les modèles induits par chirurgie	53
1.2.7.3	Induits chimiquement	54
2.	Les nutraceutiques.....	55
2.1	Définition et législation	55
2.2	Classification des nutraceutiques.....	56
2.3	Exemple du raisin et l'olive : deux fruits riches en polyphénols et aux nombreuses propriétés santé	58
2.3.1	Histoire et composition du raisin et de l'olive.....	58
2.3.1.1	Présentation du raisin	58
2.3.1.2	Présentation de l'olive.....	60
2.4	Biodisponibilité des composés phénoliques: généralités	61
2.4.1	Biodisponibilité des procyanidines.....	63
2.4.2	Biodisponibilité de l'hydroxytyrosol.....	64
2.5	Rôle des composés phénoliques issus du raisin et de l'olive dans la prévention de maladies liées à l'âge.....	64
2.5.1	Activité antioxydante des procyanidines et de l'hydroxytyrosol	64
2.5.2	Effets des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur des lignées cellulaires et certaines formes de cancer	65
2.5.3	Effets protecteurs des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur le système cardiovasculaire.....	70
2.5.4	Effets des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur d'autres maladies.....	72
3.	Les nutraceutiques dans la prévention de l'arthrose	73
II-	OBJECTIF DE LA THÈSE :	76
III-	DONNÉES EXPERIMENTALES	79
IV-	CONCLUSION GÉNÉRALE & DISCUSSION.....	89
V-	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Définitions et caractéristiques des différents types d'articulations	13
Tableau 2 : Proposition des différents phénotypes cliniques de l'arthrose	31
Tableau 3 : Antalgiques prescrits dans le traitement de l'arthrose.....	45
Tableau 4 : Recommandations d'utilisation des AASAL oraux..	47
Tableau 5 : Principaux polyphénols du raisin et distributions	59
Tableau 6 : Principaux polyphénols de l'olive et de son huile	60
Tableau 7 : Principales études du potentiel des procyanidines sur différentes lignées cancéreuses et formes de cancer	66
Tableau 8 : Principales études du potentiel de l'hydroxytyrosol sur différentes lignées cancéreuses et formes de cancer	68
Tableau 9 : Principales études scientifiques du potentiel des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur la prévention ou le traitement de l'arthrose.....	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique d'une articulation fémoro-tibiale saine.....	14
Figure 2 : Schéma de la topographie des cartilages chez l'homme.....	14
Figure 3: Représentation schématique de la composition du cartilage articulaire.....	15
Figure 4: Organisation histologique des composants biochimiques du cartilage articulaire.....	16
Figure 5: Structure des glycosaminoglycanes.....	19
Figure 6 : Structure d'un agrégat de protéoglycans (PG).....	20
Figure 7: Architecture du cartilage: organisation par zone.....	21
Figure 8: Grades OARSI de classification de l'arthrose.....	27
Figure 9 : Les voies d'activations classique et alternative de NF- κ B.....	35
Figure 10 : Les principales voies d'activation des MAPKs.....	36
Figure 11 : Schéma frontal d'une articulation et de ses ligaments.....	54
Figure 12 : classification des composés phénoliques.....	57
Figure 13 : Les transformations post-ingestion des composés phénoliques.....	62
Figure 14 : Schéma expérimental de l'approche <i>in vitro</i>	82
Figure 15 : Schéma expérimental de l'approche <i>ex vivo</i>	83
Figure 16 : Effets anti-IL-1 β des procyanidines et l'hydroxytyrosol seuls ou en association ainsi que leurs métabolites <i>in vivo</i> dans les chondrocytes.....	84
Figure 17 : Schéma expérimental de l'approche <i>in vivo</i> chez la souris.....	86
Figure 18 : Schéma expérimental de l'approche <i>in vivo</i> chez le lapin.....	87
Figure 19 : Dosage Fib3-2 réalisée sur des séra de souris ayant reçu une alimentation supplémentée ou non 8 semaines après chirurgie (DMM).....	93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidomique
AASAL	Anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente
ADAMs	A disintegrin and metalloprotease
ADAMTs	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif
AH	Acide hyaluronique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMP	Bone morphogenic protein
CMD	Coordination group for mutual recognition and decentralised procedures
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
COMT	Catéchol-méthyltransférase
COX	Cyclooxygénase
CRP	C-reactive protein
CS	Chondroïtine sulfate
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FGF23	Fibroblast growth factor 23
GAG	Glycosaminoglycane
GlcN	Glucosamine
GRO	Growth-related oncogene
HCl	Acide chlorhydrique
IAS	Insaponifiable d'avocat et de soja
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporel
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LPS	Lipopolysaccharide
MEC	Matrice extracellulaire
MIA	Mono-iodoacétate
MMP	Matrix metalloproteinase
MTF1	Metal-regulatory transcription factor 1

nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
PG	Protéoglycane
PGE₂	Prostaglandine E ₂
PRELP	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
ROS	Reactive oxygen species
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor necrosis factor
WOMAC	Western Ontario and Mc Master University

AVANT-PROPOS

Contexte et objectif de l'étude

L'arthrose est une pathologie qui, face au vieillissement de la population dans les pays industrialisés, constitue un véritable enjeu de santé publique. Elle affecte entre 10 et 15 millions de personnes en France et les personnes âgées sont les plus exposées avec 70% des plus de 65 ans présentant des signes d'arthrose. Cette pathologie affecte essentiellement les genoux, les mains, les hanches et les étages lombaires et cervicaux de la colonne vertébrale (Buckwalter and Martin 2006; Felson 2009; Rannou *et al.* 2010).

L'arthrose est souvent présentée comme une « usure » du cartilage, qui, en vieillissant, tend à perdre son élasticité. Cependant, les résultats des recherches récentes montrent que l'arthrose doit être considérée aujourd'hui comme un syndrome non seulement dégénératif mais également inflammatoire. Il s'agit, en effet, d'une pathologie complexe qui affecte l'ensemble des tissus articulaires (cartilage, os sous-chondral, membrane synoviale, ligaments, tendons) (Samuels *et al.* 2008; Clouet *et al.* 2009; Rannou *et al.* 2010). Parmi ces tissus, l'os sous-chondral a souvent un rôle de premier plan dans le développement de la maladie (Pelletier *et al.* 2004). Une fois établie, l'arthrose se caractérise par une diminution de l'épaisseur du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes et par une modification des caractéristiques du liquide synovial (augmentation du volume, augmentation de la viscosité et perte de ses propriétés de lubrification) (Mobasheri *et al.* 2008; Samuels *et al.* 2008). A l'échelle moléculaire, l'arthrose est liée à une destruction progressive de la matrice du cartilage. Cette destruction est le résultat d'un déséquilibre entre la dégradation (catabolisme) et la synthèse (anabolisme) des composants de cette matrice et enclenche un processus inflammatoire local.

Actuellement, parmi les différentes solutions thérapeutiques existantes, aucune ne permet de traiter ou d'endiguer le processus arthrosique. La prise en charge des patients associe un traitement non-pharmacologique (rééducation, orthèse, semelle, régime amaigrissant...) à un traitement pharmacologique. Les traitements proposés permettent essentiellement de traiter les symptômes douloureux de l'arthrose (analgésiques et anti-inflammatoires) (Philipps and Brasington 2010). Dans le but de retarder ou de prévenir l'apparition de telles lésions arthrosiques, des approches chirurgicales ont également été développées (lavage, débridement, microfracture, mosaïcplastie, greffe de chondrocytes autologues, ...) (Hunziker 2002). Toutefois l'arthrose reste la principale cause de pose de prothèse de genou (environ 60 000/an en France). Aujourd'hui, l'enjeu des recherches consiste, notamment, à trouver des traitements ciblant les origines moléculaires de l'arthrose en s'intéressant en particulier à la composante inflammatoire de la maladie. C'est pourquoi les recherches se tournent vers le développement de traitements préventifs et notamment vers les nutraceutiques (Khanna *et al.* 2007).

La prévention de l'apparition de l'arthrose, grâce au recours à des nutraceutiques, pourrait constituer une stratégie prometteuse, c'est pourquoi, dans le cadre d'une collaboration entre le LIOAD et la société GRAP'SUD, nous nous intéressons à l'évaluation des effets de composés phénoliques extraits de raisin et d'olive dans le contexte articulaire.

Ce projet vise donc à étudier, les effets de trois extraits d'origine végétale, titrés en phénols et polyphénols: l'Olivex® (un extrait d'olives), l'Exgrape®SEED (un extrait de pépins de raisins) et l'Oléogrape®SEED (un extrait de pépins de raisins et d'olives) dans la prévention de l'arthrose.

Dans une première partie, les généralités relatives à la physiopathologie de l'arthrose et aux nutraceutiques seront abordées. L'articulation y sera décrite dans des conditions physiologique et pathologique, les mécanismes moléculaires connus qui gouvernent le catabolisme seront notamment détaillés. Un chapitre démontrera comment les traitements actuels ne permettent pas de ralentir le développement de l'arthrose ou de traiter les tissus lésés mettant en évidence un manque thérapeutique. Le concept des nutraceutiques dans la prévention et le traitement des maladies liées à l'âge et plus particulièrement des procyanidines issues du raisin et de l'hydroxytyrosol provenant de l'olive sera ensuite introduit. Enfin, une attention particulière sera apportée à l'intérêt de l'utilisation des nutraceutiques dans la prévention ou le traitement de l'arthrose (article 1, revue de synthèse: « *Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools* »).

La seconde partie expérimentale de ce travail de thèse sera centrée sur l'intérêt de l'utilisation des procyanidines et de l'hydroxytyrosol provenant d'extraits de raisin et d'olive dans la prévention et l'installation de l'arthrose. Dans un premier temps ce travail se consacrera à une étude *in vitro* au cours de laquelle l'effet anti-IL-1 β des extraits sera présenté afin d'appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. L'intérêt préclinique de ce concept sera finalement démontré par des études de biodisponibilité et de bioactivité après ingestion dans des modèles animaux herbivores et omnivores (article 2: « *Procyanidins/hydroxytyrosol association and their in vivo metabolites exhibit anti-IL-1 β activities: potential application to osteoarthritis treatment* »). Dans un second temps les effets des extraits sur la sévérité de l'arthrose seront évalués par une approche *in vivo* dans deux modèles précliniques d'arthrose post-traumatiques (article 3: « *Hydroxytyrosol and procyanidins consumption decreases the severity of post-traumatic osteoarthritis in mice and rabbits preclinical models* »).

Pour clore ce travail, une conclusion générale résumera l'ensemble de ces travaux et permettra d'aborder les perspectives actuelles de la prévention nutritionnelle de l'arthrose.

I- ÉTAT DE L'ART

1. Le cartilage articulaire : de la physiopathologie au traitement de l'arthrose

1.1 L'articulation saine

L'articulation est une unité fonctionnelle permettant la liaison de pièces osseuses. Au cours du développement, la formation des articulations débute à la 5^{ème} semaine de vie intra-utérine (Larsen *et al.* 2011). Elles dérivent d'un tissu mésenchymateux non différencié localisé entre les pièces osseuses. Ce mésenchyme peut se différencier donnant naissance à quatre grands types d'articulations : amphiarthrose, synarthrose, diarthrose et énarthrose (Tableau 1).

Tableau 1 : Définitions et caractéristiques des différents types d'articulations. Inspiré de Clouet, 2010 (Clouet 2010).

Type d'articulation	Définition	Localisation
Amphiarthrose	Articulation semi-mobile dans laquelle les surfaces articulaires sont réunies par des ligaments fibreux ou fibro-cartilagineux.	Symphyse pubienne, disque intervertébral.
Synarthrose	Articulation fibreuse fixe entre deux os immobiles.	Sutures crâniennes.
Diarthrose	Articulation synoviale mobile.	Vertèbres, coudes, genoux, chevilles.
Énarthrose	Articulation à trois axes mobile aux surfaces sphériques, l'une étant convexe et l'autre concave.	Epaules, hanches.

L'extrémité des pièces osseuses des articulations de type diarthrose et énarthrose est recouverte de cartilage articulaire hyalin. L'ensemble est maintenu dans une cavité appelée capsule articulaire dont la face interne est recouverte de la membrane synoviale. Le ligament est un tissu conjonctif fibreux liant deux pièces osseuses entre elles et qui assure la stabilisation de l'articulation. Les ménisques sont des structures semi-lunaires de fibrocartilage disposées à l'interface de certaines surfaces articulaires (*e.g.* entre le tibia et le fémur) (Figure 1).

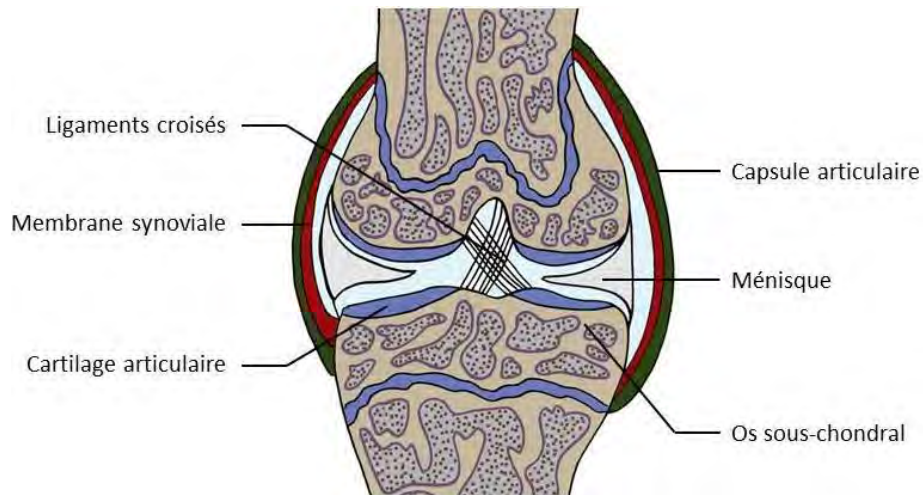


Figure 1: Représentation schématique d'une articulation fémoro-tibiale saine. Modifiée d'après Mével et al., 2014 (Mével et al. 2014).

La cohésion de ces structures forme un organe fonctionnel qui permet le glissement des surfaces articulaires grâce à un coefficient de friction très faible ainsi que de pallier les forces de compression et de tension importantes imposées par le mouvement (Hardin et al. 2015).

1.1.1 Le cartilage articulaire

Il existe trois types de cartilage : hyalin, élastique et fibreux (Figure 2). Ces tissus cartilagineux servent de soutien flexible à l'organisme (Campbell and Reece 2004).

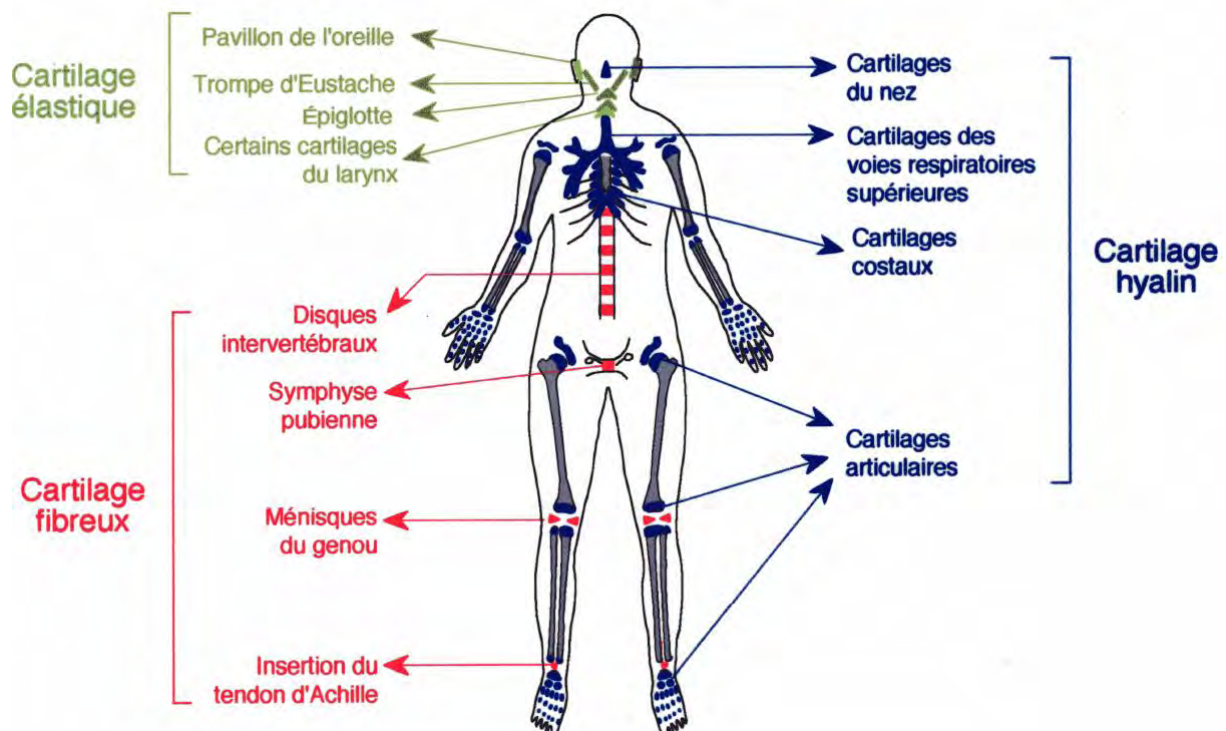


Figure 2 : Schéma de la topographie des cartilages chez l'homme. (Clément-Bouheddi 2005)

Etant donné l'objet de ce travail, seul le cartilage de type hyalin sera développé ici. Ce dernier est à la fois rigide et flexible ce qui lui confère une résistance aux forces de compression et de tension imposées par la mobilité de l'articulation. Outre ses propriétés mécaniques, le cartilage articulaire est totalement avasculaire et dépourvu de drainage lymphatique. La nutrition du cartilage articulaire s'effectue ainsi par imbibition grâce au liquide synovial et au sang provenant de l'os sous-chondral adjacent (Le Gros Clark 1965; Huber *et al.* 2000). Une compréhension détaillée de la structure et la fonction du cartilage articulaire en conditions physiologiques est nécessaire afin d'appréhender les changements fonctionnels qui se produisent dans l'articulation en conditions pathologiques.

1.1.1.1 Composition du cartilage articulaire

L'eau est l'élément le plus abondant du cartilage articulaire (70-80%). Elle est retenue au sein de la matrice extracellulaire (MEC) constituée d'un réseau dense de fibres de collagènes et d'un gel de protéoglycanes (PG), majoritairement de l'agrécane. Le cartilage est un tissu peu cellularisé, contenant majoritairement des chondrocytes (Figure 3) (Aigner and Stove 2003). Cependant, des cellules progénitrices mésenchymateuses ont été identifiées dans la couche superficielle du cartilage articulaire (Alsalameh *et al.* 2004).

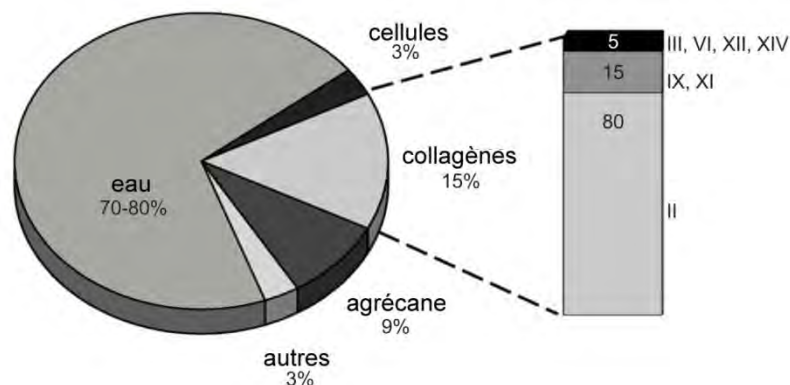


Figure 3: Représentation schématique de la composition du cartilage articulaire. Modifiée d'après Aigner *et al.*, 2003 (Aigner and Stove 2003)

1.1.1.1.1 Les cellules du cartilage : les chondrocytes

Les chondrocytes articulaires présentent une morphologie normalement ronde ou polygonale, mais peuvent également présenter une morphologie aplatie ou discoïde en fonction de leur localisation au sein du cartilage articulaire (Stockwell 1978). Les chondrocytes sont disposés dans des loges, les chondroplastes mono ou poly cellulaires. Chaque chondrocyte est entouré par une matrice péricellulaire, formant une unité appelée le chondron (Poole *et al.* 1987; Poole 1997). Les chondrocytes constituent 3% de la composition totale du cartilage (Figure 3) (Aigner and Stove 2003). Le chondrocyte est l'architecte du cartilage, sa fonction est d'assurer le renouvellement de la MEC par sécrétion de collagène et PG et sa dégradation par production d'enzymes protéolytiques. Ses

activités sont régulées par des facteurs de croissance et des médiateurs chimiques de l'inflammation. En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre ces deux fonctions, ce qui permet le maintien de l'intégrité du cartilage (Aigner and Stove 2003). Au cours du vieillissement, le nombre de chondrocytes diminue, il est divisé par 7 au cours de la vie (Corvol 2000). Cette paupérisation cellulaire conduit à un déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme, la dégradation prend ainsi le pas sur la néo-synthèse conduisant à la fragilisation de la MEC (Stockwell 1978; Corvol 2000).

1.1.1.1.2 La matrice extracellulaire (MEC) du cartilage

La MEC du cartilage est composée d'un maillage de fibres de collagènes servant de charpente qui baignent dans une substance fondamentale composée principalement de glycosaminoglycanes et d'électrolytes dissouts dans de l'eau (Huber *et al.* 2000; Hall 2015). Elle est très abondante dans le cartilage articulaire et occupe 90% de la masse de cartilage sec (Knudson and Knudson 2001).

La composition biochimique de la MEC varie en fonction de l'âge mais également des zones (Huber *et al.* 2000; Clouet *et al.* 2009). Ainsi, le contenu en PG devient plus important dans les zones les plus profondes du cartilage jusqu'à atteindre son maximum dans le cartilage calcifié pour ensuite se raréfier dans l'os sous-chondral. L'eau quant à elle se raréfie avec la profondeur (Clouet *et al.* 2009). Ces différences de répartition des composants de la MEC sont illustrées sur le schéma ci-dessous (Figure 4).

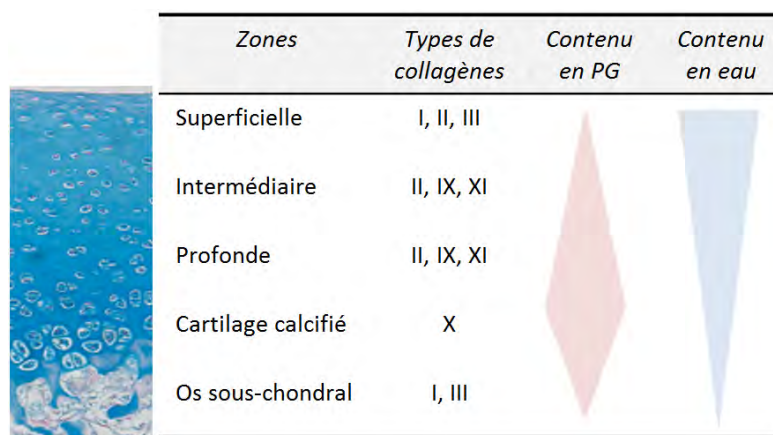


Figure 4: Organisation histologique des composants biochimiques du cartilage articulaire. Modifiée d'après Clouet *et al.*, 2009 (Clouet *et al.* 2009).

Les collagènes

Les collagènes représentent les 2/3 du poids sec du cartilage articulaire humain (Eyre 2002). Il existe douze formes de collagène dans le cartilage articulaire, les principaux incluant les collagènes de type I, II, III, IX, X et XI. Les collagènes de type V, VI, XII, XIII, XIV et XVI sont également présents dans le cartilage articulaire mais en quantités plus faibles. Par ailleurs, leur fonction étant peu décrites dans la littérature à ce jour, ils ne seront pas abordés ici.

Collagène de type I : Le collagène de type I est présent majoritairement dans la zone superficielle du cartilage articulaire (Ronziere *et al.* 1990; von der Mark *et al.* 1992; Clouet *et al.* 2009; Hall 2015). Il est largement répandu dans les tissus fibreux comme les tendons, les ligaments ou encore le fibrocartilage (Goldwasser *et al.* 1982; Ronziere *et al.* 1990; Aigner and Stove 2003). Le collagène de type I est constitué de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ (Naumann *et al.* 2002).

Collagène de type II : Le collagène de type II est la protéine la plus abondante du cartilage articulaire. Ce dernier représente 80 à 90% des collagènes totaux du cartilage articulaire (Knudson and Knudson 2001; Aigner and Stove 2003). Ce type de collagène est également retrouvé dans les tissus fibrocartilagineux comme le disque intervertébral (Eyre *et al.* 2002). Le collagène de type II est le produit du gène COL2A1, et la protéine est un homotrimère composé de trois chaînes $\alpha 1(II)$. Il existe deux formes majoritaires de transcrite du gène COL2A1, les ARNm de type IIA et IIB. Les isoformes IIA et IIB diffèrent uniquement par la présence ou non de l'exon 2 qui peut subir un épissage alternatif. L'exon 2, qui code pour une région riche en cystéine au niveau du peptide du pro-collagène, est présent dans la forme IIA. Le transcrite de la forme IIA est principalement exprimé dans les tissus non-chondrogéniques, mais également dans les zones de développement cartilagineux (Muir 1995). L'isoforme IIB est, quant à elle, exprimée dans les chondrocytes du cartilage mature (Sandell *et al.* 1991). Sa possibilité d'extension est faible, ce qui confère au cartilage une grande rigidité qui lui permet de résister aux contraintes mécaniques (Muir 1995).

Collagène de type III : Le collagène de type III est présent dans la zone superficielle du cartilage et dans l'os sous-chondral (Clouet *et al.* 2009). Cette molécule homotrimérique contribue souvent à la formation de fibrilles mixtes en association avec le collagène de type I et est également abondante dans les tissus élastiques (Gelse *et al.* 2003). Cet isotype présente un diamètre pouvant varier de 30 à 130 nm (Matthews *et al.* 2002). Des études de réticulation confirment que le collagène de type III est co-polymérisé et lié au collagène de type II dans le cartilage articulaire humain en tant que composant mineur mais régulier (Eyre 2002).

Collagène de type IX : Le collagène de type IX est présent dans les couches intermédiaires et profondes du cartilage (Figure 4) (Clouet *et al.* 2009). Le collagène de type IX est une molécule hétérotrimérique composée de trois chaînes α : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (Ichimura *et al.* 2000). C'est un collagène non fibrillaire situé à la surface des fibrilles de collagène de type II orienté de manière antiparallèle (Ronziere *et al.* 1990; Poole *et al.* 2002; Aigner and Stove 2003). Au stade embryonnaire, il représente 10% du collagène total et se raréfie pour atteindre seulement 1 à 2% dans le cartilage adulte (Knudson and Knudson 2001). Le collagène de type IX interagit avec d'autres composants de la MEC et pourrait à la fois se lier et séparer les fibres de collagène de type II (Wu *et al.* 1992; Yada *et al.* 1992; Mallein-Gerin *et al.* 1995).

Collagène de type X : Dans le cartilage adulte normal, le collagène de type X est localisé uniquement dans la zone calcifiée (Girkontaite *et al.* 1996). Il est directement impliqué dans la calcification de cette zone (Girkontaite *et al.* 1996; Aigner and Stove 2003). En condition arthrosique, le collagène de type X est exprimé autour des chondrocytes hypertrophiques et des clusters (*i.e.* groupement de chondrocytes) (von der Mark *et al.* 1992; Girkontaite *et al.* 1996; Lotz 1999).

Collagène de type XI : Le collagène de type XI, tout comme le collagène de type IX est retrouvé dans les zones intermédiaire et profonde du cartilage articulaire (Figure 4) (Clouet *et al.* 2009). Il est localisé au cœur des fibrilles de collagène II. De par sa localisation stratégique, il est impliqué dans l'assemblage et la régulation du diamètre des fibrilles de collagène (Ronziere *et al.* 1990; Aigner and Stove 2003).

Les glycosaminoglycans (GAG) et les protéoglycans (PG)

Les glycosaminoglycans (GAG) sont une famille de polysaccharides complexes, linéaires et non ramifiés. Ils partagent une organisation structurale commune, basée sur une séquence disaccharidique dont l'une des unités osidiques est soit un N-acétylgalactosamine soit un N-acétylglucosamine et la seconde unité est un ose acide (acide glucuronique ou acide iduronique). Les différentes unités sont variablement sulfatées (Figure 5). La nature des sucres formant ces unités disaccharidiques, ainsi que les types des liaisons glycosidiques impliquées, permettent de définir 5 membres de cette famille. Les GAG peuvent être classés de la manière suivante : sulfatés ou non sulfatés. Parmi les GAG sulfatés du cartilage, figurent la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate. Il existe un seul GAG non sulfaté, il s'agit de l'acide hyaluronique (AH) (Roughley and Lee 1994).

La chondroïtine sulfate est un polysaccharide linéaire composé d'une répétition d'unités d'acide glucuronique et N-acétylgalactosamine portant des groupements sulfate. La longueur du polymère est susceptible de varier avec l'âge, le site anatomique et l'état de santé. Ainsi, la chondroïtine sulfate varie en terme de longueur et de localisation des groupements sulfate d'un cartilage à un autre (Roughley and Lee 1994).

Le dermatane sulfate a longtemps été considéré comme une sous-classe de la chondroïtine sulfate et conserve d'ailleurs le nom de « chondroïtine sulfate B ». Cette ambiguïté vient du fait que le dermatane sulfate partage une grande analogie structurale avec la chondroïtine sulfate. En dépit de cela, il diffère de cette dernière par la présence d'un résidu d'acide iduronique à la place du résidu d'acide glucuronique (Roughley and Lee 1994).

Le kératane sulfate est le seul GAG qui ne possède pas de résidu d'acide uronique. Ce dernier est remplacé par une unité de galactose (Poole 1986; Roughley and Lee 1994). Le kératane sulfate diffère également des autres GAG sulfatés par son mode d'attache à la protéine de liaison (Roughley and Lee 1994).

L'héparane sulfate se différencie des autres GAG par sa présence restreinte dans les membranes basales, principalement associé au collagène (Roughley and Lee 1994). Comme son nom l'indique, il est structuralement apparenté à l'héparine, mais cette dernière n'est pas un constituant des tissus conjonctifs.

L'AH est un GAG caractérisé par une longue taille et un mode de synthèse unique (Roughley 2006). Outre le fait qu'il ne soit pas sulfaté, il a la particularité de ne se lier à aucune protéine axiale (Moreland 2003). L'AH est majoritairement présent sous forme liée à des protéines de liaisons ou des agrécans mais une minorité se trouve sous forme libre (Huber *et al.* 2000). Lorsque l'AH se lie aux fibres de collagènes, cela permet la rétention des agrécans dans la MEC. C'est une molécule synthétisée et sécrétée abondamment par le chondrocyte, en particulier dans la zone intermédiaire du cartilage.


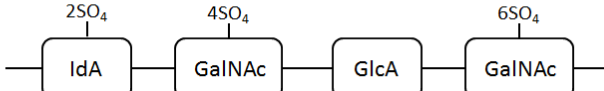


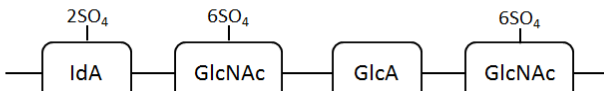
GAG	Nombre de disaccharides	Structure
CS	50	 <p>Diagram showing the repeating disaccharide unit of Chondroitin sulfate (CS): GlcA (with 4SO₄ at C4) linked to GalNAc (with 6SO₄ at C6), followed by GlcA and GalNAc.</p>
DS	50	 <p>Diagram showing the repeating disaccharide unit of Dermatan sulfate (DS): IdA (with 2SO₄ at C2) linked to GalNAc (with 4SO₄ at C4), followed by GlcA (with 6SO₄ at C6) and GalNAc.</p>
KS	15	 <p>Diagram showing the repeating disaccharide unit of Keratan sulfate (KS): Gal (with 6SO₄ at C6) linked to GlcNAc (with 6SO₄ at C6), followed by Gal (with 6SO₄ at C6) and GlcNAc (with 6SO₄ at C6).</p>
AH	10 000	 <p>Diagram showing the repeating disaccharide unit of Hyaluronic acid (AH): GlcA linked to GlcNAc, followed by GlcA and GlcNAc.</p>
HS	50	 <p>Diagram showing the repeating disaccharide unit of Heparan sulfate (HS): IdA (with 2SO₄ at C2) linked to GlcNAc (with 6SO₄ at C6), followed by GlcA (with 6SO₄ at C6) and GlcNAc (with 6SO₄ at C6).</p>

Figure 5: Structure des glycosaminoglycanes. CS : Chondroïtine sulfate ; DS : dermatane sulfate ; KS : kératane sulfate ; AH : acide hyaluronique ; HS : héparane sulfate ; GlcA : acide glucuronique ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; IdA : acide iduronique ; Gal : galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; SO₄ : sulfate. Modifiée d'après Roughley *et al.* 1994 (Roughley and Lee 1994).

Un PG est une macromolécule complexe constituée d'une protéine axiale sur laquelle sont associées de manière covalente une ou plusieurs chaînes de GAG. Les propriétés fonctionnelles des PG et leur classification dépendent de la séquence polypeptidique de leur core protéique, de la nature de leurs chaînes de GAG et de leur localisation. L'agrécane constitue 90% de la masse totale des PG du cartilage (Huber *et al.* 2000; Knudson and Knudson 2001). Il interagit avec l'AH, et forme en compagnie de protéines de liaison des structures de haut poids moléculaire (Figure 6). Ces agrégats de PG présentent des propriétés de rétention d'eau exceptionnelle (volume hydrodynamique mille

fois supérieur à leur propre volume) et confèrent au cartilage ses caractéristiques physiques d'hydratation, d'élasticité et de résistance au stress mécanique contribuant ainsi à sa longévité (Iozzo 1998; Huber *et al.* 2000; Dudhia 2005).

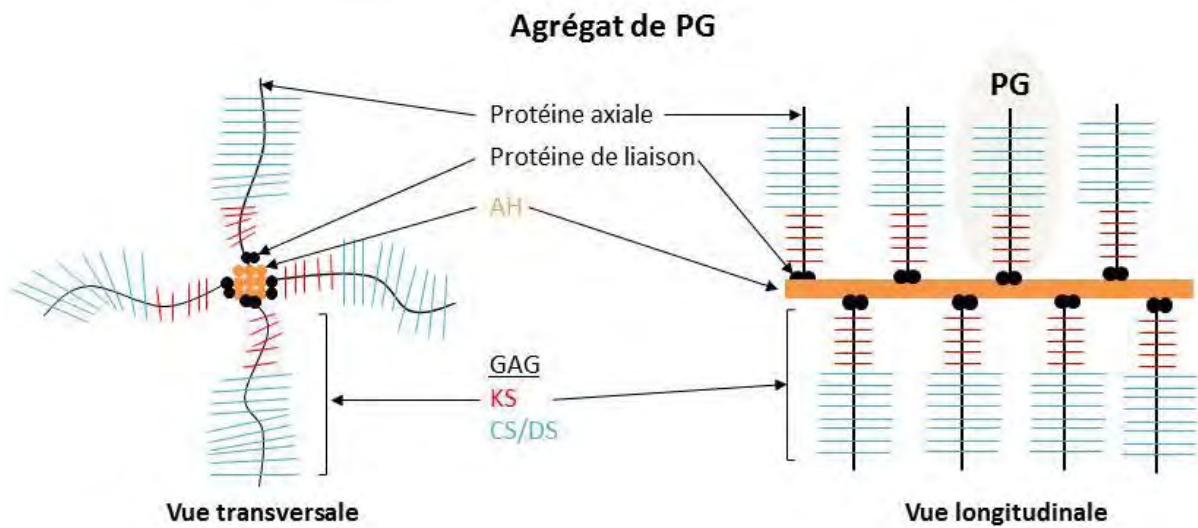


Figure 6 : Structure d'un agrégat de protéoglycans (PG). AH : Acide hyaluronique ; GAG : glycosaminoglycane ; KS : kératane sulfate ; CS : chondroïtine sulfate.

Les autres protéines non-collagéniques

Plusieurs autres protéines dites minoritaires sont présentes dans la MEC du cartilage articulaire. Malgré une présence en quantité faible, elles n'en restent pas moins importantes dans la structure et la fonction du cartilage. C'est le cas des petits protéoglycans riches en leucine (SLRP « *small leucin rich proteoglycans* ») tels que la décorine, le biglycane, la fibromoduline et le lumican qui participent au maintien de l'intégrité de la matrice par leurs interactions avec le réseau de fibres de collagènes, leurs densités de charges et leurs liaisons avec des facteurs de croissance (Goldring 2000). D'autre part, la protéine à répétition riche en leucine à extrémité riche en proline/arginine (PRELP), la chondroadhérine et l'anchorine II, sont impliquées dans l'ancrage des chondrocytes dans la matrice environnante grâce à des protéines membranaires (type intégrines et syndécane) (Goldring 2000; Huber *et al.* 2000). Certaines influencent les interactions entre les chondrocytes et la matrice, la ténascine et la fibronectine en sont les exemples (Huber *et al.* 2000). D'autres contribuent à la formation du réseau fibrillaire de la MEC comme les matrilines (Mouw *et al.* 2014). Enfin, la protéine oligomérique matricielle du cartilage (COMP) possède plusieurs fonctions essentielles : (i) elle permet la liaison des autres protéines de la MEC, (ii) elle catalyse la polymérisation des fibrilles de collagène de type II, et (iii) elle régule la prolifération des chondrocytes (Posey and Hecht 2008).

1.1.1.2 Organisation du cartilage articulaire

Le cartilage hyalin possède 4 zones distinctes, chaque zone est caractérisée par la morphologie des chondrocytes, l'orientation des fibres de collagène et la teneur en PG (Figure 7) (Huber *et al.* 2000; Eyre 2002; Matta and Zakany 2013):

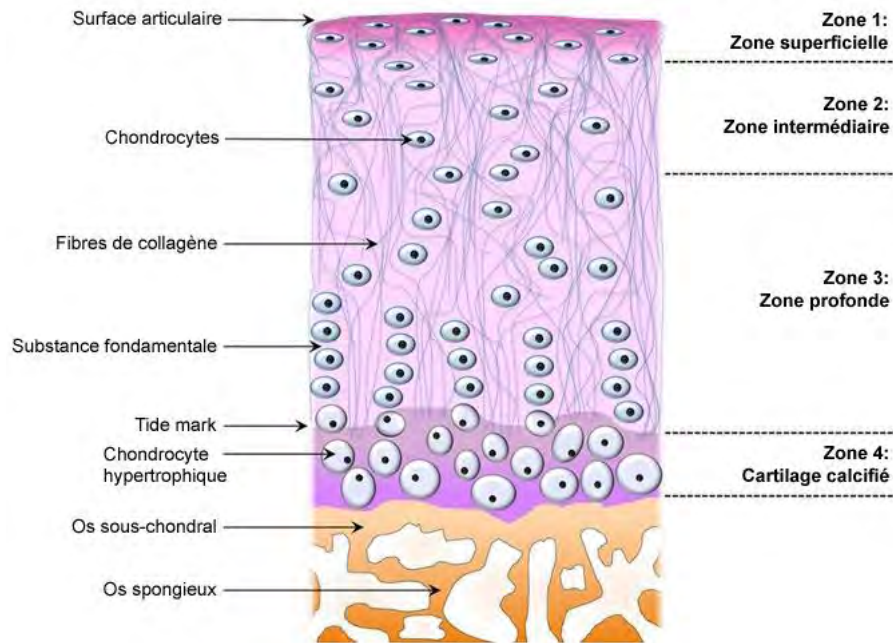


Figure 7: Architecture du cartilage: organisation par zone. Modifiée d'après Matta *et al.*, 2013 (Matta and Zakany 2013).

Zone superficielle ou tangentielle : les fibres de collagène sont orientées parallèlement à la surface tout comme les chondrocytes qui y sont denses et présentent une forme allongée. Le contenu en PG est faible.

Zone intermédiaire ou transitionnelle : les fibres de collagène sont disposées aléatoirement et dirigées obliquement, les chondrocytes ont une forme ovoïde et sont répartis de manière anarchique dans la matrice qui est riche en PG.

Zone profonde ou radiale : les fibres de collagène sont orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes ont toujours une forme ronde et disposés en colonnes verticales. La matrice est riche en PG.

Cartilage calcifié : c'est la zone de transition entre le cartilage et l'os sous-chondral. Elle débute par une fine ligne irrégulière, appelée la « *tide mark* » à l'interface avec la zone profonde. L'agencement est quasiment identique à celui de la couche profonde. Les fibres de collagène s'ancrent dans l'os sous-jacent, permettant ainsi la fusion du cartilage avec l'os. Les chondrocytes s'hypertrophient et perdent leur organisation en colonne, leurs noyaux deviennent pycnotiques (*i.e.* condensation de la chromatine). C'est la zone la plus riche en PG du cartilage.

1.1.2 Le tissu osseux

L'os sous-chondral constitue une barrière physique entre le cartilage articulaire et l'os constituant l'épiphyse. Il mesure quelques millimètres d'épaisseur chez l'homme. C'est un tissu calcifié jouant un rôle clé dans l'amortissement des chocs transmis par le cartilage et imposés par le mouvement des segments anatomiques. L'os est un tissu conjonctif spécialisé et minéralisé. Il est composé d'une MEC servant de microenvironnement aux cellules osseuses. Ces différentes entités du tissu osseux, ainsi que ses fonctions, sont détaillées ci-dessous.

1.1.2.1 Structure et composition du tissu osseux

Les cellules de l'os

Les cellules de l'os permettent la formation et l'entretien du tissu, elles sont de quatre types:

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices (*i.e.* synthétisent les constituants de la matrice osseuse). Elles ont également pour fonction de réguler la minéralisation en contrôlant les concentrations locales en ions calcium et phosphate (Orimo 2010).

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés enchâssés au sein la MEC au sein de loges appelées ostéoplastes (Toppets *et al.* 2004). Ce sont des cellules sensibles aux stimuli mécaniques qui détectent le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation fonctionnelle ou en cas de micro-fractures (Manolagas 2000).

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes à l'état quiescent. Elles constituent une réserve de cellules ostéoblastiques pouvant être mobilisées suite à l'action de facteurs locaux ou systémiques notamment au cours du remodelage et de la réparation osseuse (Parfitt *et al.* 1996).

Les ostéoclastes sont des cellules ostéorésorbantes (*i.e.* participent à la résorption de la structure). Ce sont des cellules géantes multinucléées ayant pour principale fonction de dégrader la matrice osseuse (Toppets *et al.* 2004).

La MEC de l'os

La MEC du tissu osseux est constituée d'une partie organique (22%), d'une partie minérale (69%) et d'eau (9%). La partie organique est composée de collagène (90% de type I), d'élastine, de PG et autres protéines (ostéopontine, ostéocalcine, ostéonectine, thrombospondine et sialoprotéine) (Toppets *et al.* 2004). Concernant la partie minérale, des ions calcium, magnésium et phosphate se combinent et s'organisent pour former un cristal appelé hydroxyapatite $[Ca_5(PO_4) OH_2]_2$, le plus abondant de la matrice. La combinaison des minéraux et du collagène rend les os plus dur que le cartilage sans qu'ils deviennent pour autant cassant (Campbell and Reece 2004).

1.1.2.2 Les fonctions du tissu osseux

De manière générale, le tissu osseux remplit quatre fonctions :

La fonction mécanique : Sa minéralisation et son architecture trabéculaire lui apporte une très grande résistance qui lui permet de supporter des contraintes mécaniques importantes. Cela lui confère un rôle dans le soutien du corps ainsi que dans la protection des organes (Toppets *et al.* 2004).

La fonction hématopoïétique : Les os renferment au sein de leurs espaces médullaires de la moelle osseuse, riche en cellules hématopoïétiques. Ces cellules sont à l'origine des cellules sanguines et certaines d'entre elles sont des cellules souches multipotentes susceptibles de se différencier en différents types cellulaires (ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes,...) (Bianco and Robey 2015; Boulais and Frenette 2015).

La fonction métabolique : Les os sont des réservoirs à minéraux, ils participent au maintien de l'équilibre phosphocalcique du corps humain. En effet, en réponse aux contraintes mécaniques, aux stimulus hormonaux ou encore à l'apport alimentaire auxquels il est soumis, l'os libère ou stock des sels minéraux, en particulier du calcium et du phosphate (Toppets *et al.* 2004).

La fonction endocrine : L'os intervient dans la régulation de la glycémie et la production des hormones sexuelles par l'intermédiaire d'une hormone, l'ostéocalcine. Cette dernière est produite par le tissu osseux et est impliquée d'une part dans la régulation du métabolisme énergétique en augmentant à la fois la production d'insuline ainsi que la sensibilité à l'insuline (Lee *et al.* 2007). D'autre part, l'ostéocalcine joue un rôle dans la régulation de la testostérone en se liant à un récepteur couplé aux protéines G exprimé dans les cellules de Leydig des testicules ce qui permet la régulation d'enzymes nécessaires à la synthèse de cette hormone (Oury *et al.* 2011; Karsenty and Oury 2014). Les cellules du tissu osseux produisent une seconde hormone, le « *fibroblast growth factor 23* » (FGF23) qui circule dans le plasma. Son rôle physiologique est maintenir la phosphatémie dans des valeurs normales en agissant sur le rein (Lederer 2014; Takashi and Fukumoto 2015).

1.1.3 **La membrane et le liquide synovial**

Le tissu synovial est constitué de deux entités : la membrane synoviale et le liquide synovial. La membrane synoviale est une structure qui tapisse la surface interne des articulations et délimite la capsule articulaire (Le Gros Clark 1965). Elle est constituée d'une assise cellulaire contenant des synoviocytes de deux types : « *macrophage-like* » (cellules A) et « *fibroblaste-like* » (cellules B) (Iwanaga *et al.* 2000). La membrane synoviale remplit trois principales fonctions :

Rôle de barrière de filtration et d'échanges : Les échanges entre l'articulation et le sang se font par l'intermédiaire de la membrane synoviale, sous l'effet des pressions hydrostatiques et osmotiques (Hui *et al.* 2011). Les cellules de la membrane synoviale contrôlent le transport des substances par

des mécanismes de phagocytose et pinocytose. Ainsi, les protéines de haut poids moléculaire ne peuvent franchir cette barrière (Iwanaga *et al.* 2000).

Rôle de défense : les cellules de type A « *macrophage-like* » présentes dans la membrane synoviale contiennent un appareil de Golgi développé, des lysozymes ainsi que de nombreuses vésicules de pinocytose. Grâce à leur artillerie cellulaire, elles assurent une activité macrophagique dirigée vers les petites particules, débris cellulaires et bactériens (Iwanaga *et al.* 2000).

Rôle de nutrition : Elle est impliquée dans la nutrition du cartilage par la production puis la sécrétion dans la cavité articulaire du liquide synovial. Le liquide synovial, est un liquide visqueux jaunâtre translucide constitué d'acide hyaluronique sécrété par les synoviocytes auquel s'ajoute un ultrafiltrat plasmatique. Il contribue à la lubrification du cartilage. Le liquide synovial a une concentration en micronutriments très proche du sérum sanguin qui l'alimente. Sa composition ionique est identique à celle du sérum, en revanche sa composition en protéine est pauvre, 19-28 mg/mL contre 65-80mg/mL dans le sang chez l'homme (Ropes *et al.* 1939; Ropes *et al.* 1940; Huber *et al.* 2000; Hui *et al.* 2011). Cela explique le rôle nourricier du liquide synovial pour le cartilage qui reste quant à lui dépourvu d'irrigation sanguine et lymphatique (Huber *et al.* 2000).

1.1.4 Les autres structures de l'articulation

Les ligaments sont des structures fibreuses permettant de relier deux pièces osseuses entre-elles. La structure organisée en faisceaux de fibres de collagène de type I leur confère une grande résistance. Les ligaments permettent la mobilité de l'articulation (Le Gros Clark 1965).

Les ménisques permettent de compenser l'incongruité des surfaces articulaires entre lesquelles ils sont interposés. Ils sont composés d'un cartilage fibreux très dense. De par leur positionnement et leur composition, ils jouent le rôle d'un tampon élastique permettant de minimiser les impacts lors de la transmission des contraintes entre deux pièces osseuses (Le Gros Clark 1965).

Le coussin adipeux (ou graisse de Hoffa) est caractéristique de l'articulation fémoro-tibio-patellaire, le coussin adipeux infra-patellaire aussi appelé graisse de Hoffa, est situé au carrefour entre le ligament fémoro-patellaire, le condyle fémoral et le plateau tibial. Il s'agit d'un tissu adipeux blanc, riche en adipocytes. Ces derniers renferment dans le cytoplasme une unique vacuole lipidique contenant des triglycérides. La graisse de Hoffa présente une surface recouverte d'une couche de membrane synoviale. Ainsi, elle est à la fois intra articulaire et extra-synovial. En condition physiologique, elle possède essentiellement une fonction endocrine (Magi *et al.* 1991; Ushiyama *et al.* 2003; Berenbaum *et al.* 2013).

1.2 L'arthrose : maladie de l'articulation

1.2.1 Définitions et classification de l'arthrose

L'arthrose est une maladie qui affecte les articulations. Elle fut pendant longtemps considérée uniquement comme l'aboutissement physiologique inéluctable du vieillissement articulaire, aggravée par des contraintes excessives ou des déformations constitutionnelles. Une meilleure compréhension du processus inflammatoire a permis d'affiner la connaissance du processus arthrosique. Moyennant toutes ces données, une nouvelle définition a pu être proposée. Ainsi, en 2003, l'arthrose est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme *«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 »*. Cette notion reste valable, cependant, au regard des connaissances nouvelles sur les processus physiopathologiques de l'arthrose, l'*Osteoarthritis research society international* (OARSI) propose en 2015 la définition suivante : *« Osteoarthritis is a disorder involving movable joints characterized by cell stress and extracellular matrix degradation initiated by micro- and macro-injury that activates maladaptive repair responses including pro-inflammatory pathways of innate immunity. The disease manifests first as a molecular derangement (abnormal joint tissue metabolism) followed by anatomic, and/or physiologic derangements (characterized by cartilage degradation, bone remodeling, osteophyte formation, joint inflammation and loss of normal joint function), that can culminate in illness »* (Kraus et al. 2015). Cette nouvelle définition intègre le caractère hétérogène de la maladie.

L'arthrose affecte essentiellement les genoux (gonarthrose), les mains (arthrose digitale), les hanches (coxarthrose) et les étages lombaires et cervicaux (discarthrose) de la colonne vertébrale (Buckwalter and Martin 2006; Felson 2009; Rannou et al. 2010).

La sévérité de l'arthrose est évaluée au moyen d'un examen radiographique. Le grade de Kellgren et Lawrence (1957) est utilisé en clinique et permet d'évaluer la sévérité de l'arthrose: articulation saine (grade 0), douteuse (grade 1), altération minime (grade 2), modérée (grade 3) et sévère (grade 4). Ce score s'appuie sur des paramètres tels que la formation d'ostéophytes et le pincement de l'espace interarticulaire (Kellgren and Lawrence 1957). Bien que cette classification ancienne soit solide, elle

ne prend pas en compte les altérations du cartilage ou encore l'inflammation, intervenant aux prémices de la maladie.

Différents scores histologiques sont employés pour standardiser la classification de l'arthrose dans les modèles animaux d'arthrose. Mankin *et al.* ont été pionniers dans ce domaine en proposant un score, le *histological-histochemical grading system* (HHGS) en 1971 plus connu sous l'éponyme « grade de Mankin ». Celui-ci permet une corrélation entre la biochimie du cartilage et la progression de l'arthrose. Ainsi, des paramètres tels que les changements cellulaires, coloration des GAG à la safranine O et les changements architecturaux (érosion, colonisation de vaisseaux dans la « *tide mark* ») sont pris en compte (Mankin *et al.* 1971). Bien que ce grade présente des avantages certains, sa reproductibilité et sa validité sont remises en question. En effet, le score de Mankin est basé sur l'analyse de têtes fémorales humaines issues d'arthroplastie. Les échantillons présentent par conséquent une arthrose sévère impliquant que les grades précoces soient mal décrits.

Ainsi, en 2000, un groupe de travail composé d'experts a proposé un nouveau score : le score de l'OARSI, qui s'est vite imposé comme le score de référence. Ce score se compose de 6 grades (Pritzker *et al.* 2005) (Figure 8). Le grade 0 correspond au cartilage normal ou sain, la surface du cartilage articulaire est lisse, la MEC et les chondrocytes sont organisés et bien orientés en quatre zones. Le grade 1, quant à lui, est caractérisé par une abrasion superficielle associée à une altération de l'organisation et aspect des chondrocytes dans la zone superficielle voir une absence de cellules. Le grade 2 présente une discontinuité focale de la zone superficielle, une abrasion par des forces de cisaillement conduisant à des fragments à l'aspect cotonneux, des fibrillations de la couche superficielle, une perte de coloration à la safranine O dans le tiers supérieur et la formation de cluster dans la zone médiane. Le grade 3 est associé à une extension des fissures matricielles s'étendant à la zone moyenne jusqu'à former des fissures verticales depuis la surface. La texture de la matrice est hétérogène avec des zones de déplétion en PG associée à une coloration plus intense autour des clusters accompagnée de l'apparition de chondrons complexes. Au grade 4, les lésions s'étendent jusqu'à l'érosion du cartilage par délamination (*i.e.* perte d'un fragment de la zone superficielle liée à l'action des forces de cisaillement) ou excavation (*i.e.* formation d'une cavité liée à la perte de la matrice, ce n'est pas un mécanisme physique car il est lié à la nécrose/dégradation de la matrice), enfin, des kystes peuvent se former au niveau de la zone médiane. Le grade 5 se caractérise par une érosion complète du cartilage hyalin atteignant le cartilage calcifié ou l'os sous-chondral. Un phénomène de réparation spontanée avec une formation de cartilage fibreux est observé. Enfin, le grade 6 est assimilé à une dénudation complète de l'os sous-chondral associée à un remodelage osseux (Figure 8).

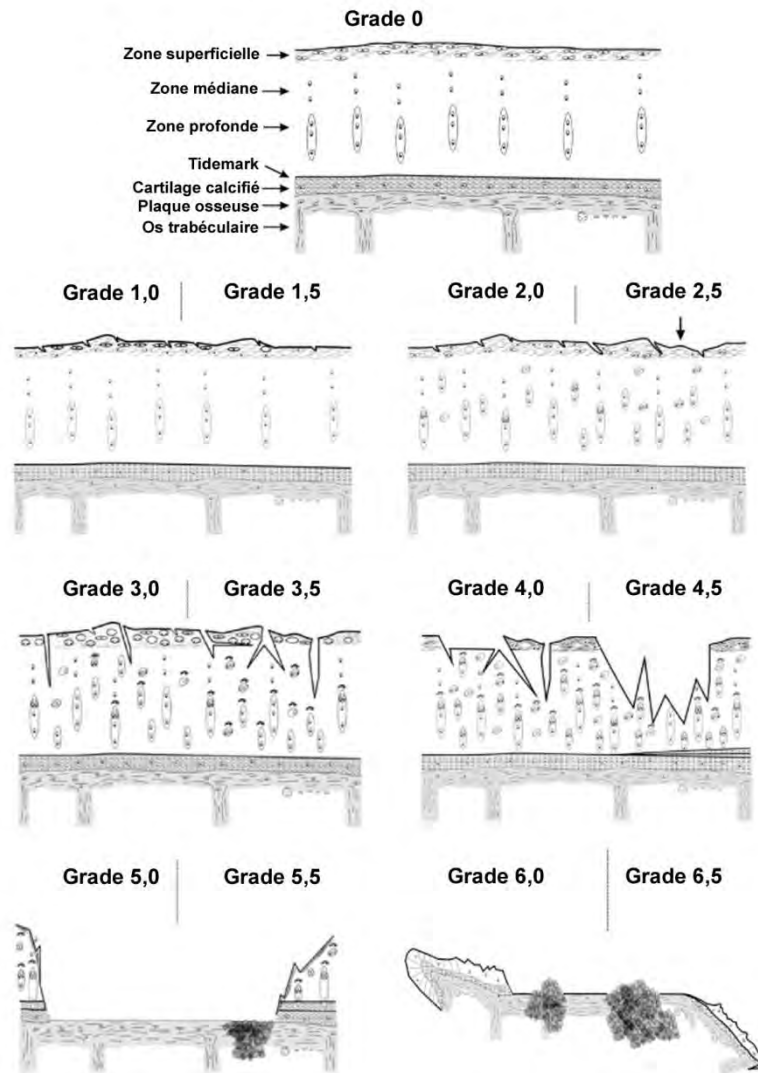


Figure 8: Grades OARSI de classification de l'arthrose. Modifiée d'après Pritzker *et al.* (Pritzker *et al.* 2005)

1.2.2 Prévalence et impact économique de l'arthrose

L'arthrose touche 9 à 10 millions de Français dont près de la moitié sont symptomatiques. Elle fait partie des maladies les plus invalidantes dans nos pays industrialisés. Elle occupe le deuxième rang des maladies chroniques après les maladies cardiovasculaires. L'arthrose croît rapidement avec l'âge, les institutions de santé estiment que 70% des plus de 65 ans en sont atteints. Il est difficile d'évaluer le nombre exact de personnes atteintes d'arthrose car beaucoup de personnes ne sont pas diagnostiquées. Les femmes sont plus touchées par l'arthrose, probablement pour des raisons hormonales (McAlindon *et al.* 1996).

En 2005, l'étude COART met en évidence les conséquences socio-économiques de l'arthrose en France. Les coûts directs de l'arthrose représentent 1,6 milliards d'euros par an, ce qui équivaut à 1,7% des dépenses de santé. La majorité des dépenses liée à l'arthrose est attribuée à la prise en charge hospitalière qui représente à elle seule 800 millions d'euros alors que 530 millions d'euros

sont imputables aux prescriptions médicamenteuses. Le nombre de patients traités est en évolution croissante tout comme le coût par patient qui augmente de 2,5% par an (Le Pen *et al.* 2005). Le vieillissement de la population est un phénomène de société qui pose de nombreux défis et tend à alourdir ce bilan. En effet, l'OMS projette que d'ici 2050 une personne sur trois sera âgée 60 ans ou plus. Du fait de sa forte prévalence et de ce fardeau économique, l'arthrose constitue actuellement un véritable enjeu de santé publique.

1.2.3 Etiologie de l'arthrose

De nombreux facteurs sont connus pour favoriser le développement de l'arthrose. Ces facteurs induisent un stress du cartilage qui impacte son métabolisme et aurait donc une incidence sur la destruction progressive du cartilage et l'apparition de l'arthrose. Les facteurs de risques liés à l'arthrose peuvent être classés en deux catégories : les risques intrinsèques (non modifiables) et extrinsèques (modifiables).

1.2.3.1 Les risques intrinsèques

Âge : le processus de vieillissement est corrélé à une augmentation de la progression de l'arthrose. Les travaux d'Oliveria *et al.* ont montré que 27% des personnes de 63 à 70 ans présentent une arthrose radiologiquement décelable contre 44% des plus de 80 ans (Oliveria *et al.* 1995).

Sexe : le genre est également un facteur de risque. En effet, les femmes présentent une plus forte prévalence que les hommes (Woolf and Pflieger 2003).

Statut hormonal : la prévalence de l'arthrose chez l'homme et la femme est comparable jusqu'à l'âge de 50 ans. Cependant, elle augmente considérablement chez la femme après la ménopause, ce qui suggère l'implication des hormones dans le développement de la maladie (Tanamas *et al.* 2011). Parmi ces hormones, de nombreuses études ont été conduites dans le but de déterminer la relation entre les œstrogènes et le développement de l'arthrose. Ces études ont révélées à la fois un rôle protecteur et délétère pour le cartilage (Linn *et al.* 2012). De manière générale, la chute de production d'œstrogènes, observée au cours de la ménopause, s'accompagne d'une augmentation de la production de *reactive oxygen species* (ROS), une activation de NF-κB et une production de cytokines pro-inflammatoires (Martin-Millan and Castaneda 2013).

Génétique : il existe une prédisposition génétique à l'arthrose (Spector and MacGregor 2004). Les enfants dont les parents développent une arthrose à un âge précoce ont plus de risques de développer eux même la maladie (Haq *et al.* 2003). En effet, le polymorphisme génétique est très important dans l'arthrose, en particulier lorsqu'il affecte des gènes codant pour des protéines structurales comme les collagènes, ou des protéines du métabolisme de l'os et du cartilage (Haq *et al.* 2003; Spector and MacGregor 2004; Clouet *et al.* 2009).

Anomalie architecturale : La déformation des articulations comme le genou *valgum* (*i.e.* jambes dites « en X ») et *varum* (*i.e.* jambes dites arquées) crée un déséquilibre dans la répartition des charges imposées à l'articulation qui peuvent à terme favoriser le développement d'une gonarthrose (Felson *et al.* 2004).

Hyperlaxité ligamentaire : Bien que l'hyperlaxité ligamentaire peut s'avérer avantageuse dans la pratique de certains sports comme la gymnastique et la danse, elle est associée à un risque de développer une arthrose précoce (Bird and Barton 1993). L'hyperlaxité ligamentaire est également observée dans le syndrome d'hypermobilité articulaire bénigne qui est une maladie génétique rare qui affecte la synthèse des collagènes fibrillaires ou de la ténascine X (*i.e.* molécule non collagénique de la matrice extracellulaire). Ainsi, les malades ont une prédisposition inhérente aux traumatismes du quotidien et donc à l'arthrose (Grahame 2000).

1.2.3.2 Les risques extrinsèques

Obésité et surpoids : De nombreuses études ont montré une corrélation entre l'obésité (IMC>30) et l'apparition d'une arthrose du genou, de la main et de la hanche (Haq *et al.* 2003; Woolf and Pflieger 2003; Felson 2004; Wang *et al.* 2015). Le tissu adipeux est considéré comme un organe métabolique endocrine. Les adipocytes libèrent des substances actives, les adipokines, telles que la leptine, adiponectine, la résistine et visfatine qui mènent à un dysfonctionnement métabolique chez les patients arthrosiques. La graisse de Hoffa constitue une source d'adipokines intra-articulaire. Les adipokines sécrétées pourraient perturber l'homéostasie du cartilage en stimulant l'expression d'enzymes protéolytiques et la production de médiateurs inflammatoires favorisant la dégradation du cartilage articulaire (Pottie *et al.* 2006; Gabay *et al.* 2008; Berenbaum *et al.* 2013; Wang *et al.* 2015).

Traumatisme : Les traumatismes (déchirures du ménisque ou des ligaments et fractures), certaines activités physiques ou professions (docker, agriculteurs, ouvriers) sont également des facteurs de risque de développer une arthrose du genou et de la hanche notamment (Woolf and Pflieger 2003). Une blessure au genou conduisant à une méniscectomie augmente le risque d'arthrose tibio-fémorale. L'étude Framingham a d'ailleurs établi que les hommes ayant des antécédents de blessure au genou augmentent de 5 à 6 fois le risque de développer une arthrose (Felson *et al.* 1995).

Tabagisme : Une étude clinique menée en 2007 a souligné l'implication du tabagisme dans la perte de cartilage ainsi que de la sévérité des douleurs aux genoux chez les hommes atteints d'arthrose en comparaison avec les non-fumeurs (Amin *et al.* 2007).

1.2.4 Altérations physiques observées au cours de l'arthrose

D'un point de vue clinique, l'arthrose se caractérise par des douleurs, une raideur, des gonflements et déformations des articulations. Les symptômes de l'arthrose se manifestent progressivement. Cela commence par des douleurs autour de l'articulation et finit par une déformation entravant la mobilité. C'est en partie une maladie mécanique, c'est-à-dire que l'articulation est douloureuse lors du mouvement et s'atténue au repos (Haq *et al.* 2003). Les signes cliniques sont variables d'un patient à un autre, mais il est possible de dénombrer cinq phénotypes cliniques avec des causes différentes : post-traumatique, métabolique, liée à l'âge, génétique et liée à la douleur (Tableau 2). Ainsi, l'arthrose est aujourd'hui considérée comme une maladie hétérogène de l'ensemble des structures qui composent une articulation. Il est ainsi raisonnable de penser que les solutions thérapeutiques les plus pertinentes devront prendre en considération cette hétérogénéité des phénotypes arthrosiques et proposer des prises en charge selon les principes de la médecine personnalisée (Buckwalter and Martin 2006; Bijlsma *et al.* 2011).

Tableau 2 : Proposition des différents phénotypes cliniques de l'arthrose. PTG : produits terminaux de glycation. Modifié d'après Bijlsma JW *et al.* 2011 (Bijlsma *et al.* 2011).

	<i>Post-traumatique (aiguë ou répétitif)</i>	<i>Métabolique</i>	<i>Vieillessement</i>	<i>Génétique</i>	<i>Douleur</i>
Âge	Jeune (<45 ans)	Moyen (45-65 ans)	Âgé (>65 ans)	Variable	Variable
Principale caractéristique étiologique	Stress mécanique	Stress mécanique, adipokines, hyperglycémie, œstrogènes/déséquilibre de progestérone	PTG, sénescence chondrocytes	Génétique	Inflammation, changements osseux, perception de la douleur accrue
Site principal	Genou, pouce, cheville, épaule	Genou, main, généralisé	Hanche, genou, main	Main, hanche, colonne vertébrale	Hanche, genou, main
Prise en charge	Protection articulaire, stabilisation articulation, prévention des chutes, interventions chirurgicales	Perte de poids, contrôle de la glycémie/lipides, traitement hormonal	Pas de prise en charge particulière, récepteur soluble de produits de glycation avancée/ inhibiteurs des PTG	Pas de prise en charge particulière, thérapie génique	Antidouleurs, anti-inflammatoires

1.2.5 Modifications moléculaires observées au cours de l'arthrose

Au niveau moléculaire, l'arthrose est le résultat d'un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme de la matrice extracellulaire du cartilage. En effet, l'homéostasie du cartilage est liée à un équilibre entre les mécanismes de dégradation sous l'influence de cytokines destructrices, et les mécanismes de réparation sous l'effet de cytokines modulatrices et de facteurs de croissance.

1.2.5.1 Les enzymes de dégradation impliquées dans le catabolisme

Les enzymes de dégradation impliquées dans le développement de l'arthrose peuvent être divisées en trois groupes: les métalloprotéases, les agrécanases et les cathepsines. La chronologie exacte de la dégradation des composants de la MEC reste actuellement méconnue. Toutefois, une étude dans un modèle d'explants de cartilage semble suggérer que la dégradation du collagène intervient seulement après celle de l'agrécan (Troeborg and Nagase 2012). Sous l'action des enzymes, des produits de dégradation sont libérés, tels que des fragments de collagène de type 2 (*e.g.* CTX-II, Coll2-1, Col 2-1NO2) (Christgau *et al.* 2001; Deberg *et al.* 2005; Huebner *et al.* 2010), de la fibuline (*e.g.* Fib3-1 et Fib 3-2) (Henrotin *et al.* 2012) et d'autres protéines comme COMP (Ahrman *et al.* 2014). Certains de ces fragments sont détectables au niveau urinaire et/ou sérique chez des patients arthrosiques et permettent ainsi de disposer de marqueurs biologiques pour le diagnostic ou le pronostic (Neame *et al.* 1999; Christgau *et al.* 2001; Deberg *et al.* 2005; Huebner *et al.* 2010; Henrotin *et al.* 2012; Ahrman *et al.* 2014). D'autres produits de dégradation restent dans le tissu encore complexé à l'AH et à la protéine de liaison c'est le cas des fragments d'agrécan (NITEGE, VIPEN, DIPEN) (Knudson and Knudson 2001; Little *et al.* 2009). Les différentes enzymes, actrices de la dégradation du cartilage, seront abordées plus longuement ci-dessous.

1.2.5.1.1 *Les métalloprotéases (MMPs)*

Les métalloprotéases (MMPs) sont des enzymes sécrétées par les cellules des tissus conjonctifs, notamment les chondrocytes, et impliquées dans le clivage des protéines de la MEC (Goldring 2000; Blom *et al.* 2007; Clutterbuck *et al.* 2008). Elles appartiennent à la superfamille des metzincines et possèdent, comme leur nom l'indique, un ion métallique qui est dans la majorité des cas un atome de zinc et qui participe à la catalyse de la coupure de la liaison peptidique. Elles sont synthétisées et liées à la membrane ou sécrétées dans la MEC sous forme de pro-enzyme et sont activées par certains stimuli (Murrell *et al.* 1995). Les cytokines telles que l'interleukine-1 bêta (IL-1 β) et le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) provenant du cartilage, de la membrane synoviale et des autres tissus environnants peuvent augmenter les niveaux d'expression des gènes et des activités des MMP par les chondrocytes (Murrell *et al.* 1995; Goldring *et al.* 2008). Les MMPs identifiées à ce jour peuvent être classées selon leur spécificité au substrat comme suit (Clutterbuck *et al.* 2008):

- Les collagénases : MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-18
- Les gélatinases : MMP-2 et MMP-9
- Les stromélysines : MMP-3, MMP-10 et MMP-11
- Les matrilysines : MMP-7 et MMP 26
- Les MMPs membranaires : MMP-14 à 17 et MMP-24 et 25
- Autres : MMP-12, MMP-19 à 23 et MMP-27 et 28

Bien que chaque MMP possède sa spécificité de substrat, ceux-ci peuvent se chevaucher, ce qui signifie qu'ensemble elles peuvent cliver une large variété de protéines de la MEC (Clutterbuck *et al.* 2008). Par exemple, MMP-13 joue un rôle important dans la dégradation du réseau de fibres de collagènes de la matrice du cartilage en clivant le collagène de type II mais aussi l'agrécane (Knauper *et al.* 1996; Reboul *et al.* 1996; Goldring 2000; Takaishi *et al.* 2008). Ceci a été démontré en partie dans un modèle de souris déficiente en MMP-13 qui sont résistantes à l'arthrose induite par chirurgie (Little *et al.* 2009). En plus de la dégradation de la MEC, les MMPs peuvent dégrader une variété de molécules biologiquement actives, telles que des cytokines, leur conférant ainsi des fonctions de contrôle cellulaire (Clutterbuck *et al.* 2008).

1.2.5.1.2 Les agrécanases

Les ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) sont des métalloprotéinases de la superfamille des metzincines endossant deux fonctions ambivalentes : protéolytique (dégradation de l'agrécane) et adhésion. Parmi les ADAMs, les ADAMTS (ADAMs avec des motifs thrombospondine) forment un sous-groupe de cette famille (Blobel 1997; Troeberg and Nagase 2012). Ces enzymes portent un ion zinc sur leur site catalytique (Kelwick *et al.* 2015). Les ADAMTS sont des protéases extracellulaires sécrétées, impliquées dans de multiples mécanismes: (i) clivage des PG de la MEC (ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9 et 15), (ii) inhibition de l'angiogénèse (ADAMTS-1 et 8), (iii) rôle dans la maturation du collagène (ADAMTS-2, 3 et 14) (Porter *et al.* 2005; Troeberg and Nagase 2012; Kelwick *et al.* 2015). Les souris transgéniques pour lesquelles le gène *Adamts5* a été invalidé, présentent une arthrose induite par chirurgie moins importante que les souris non modifiées. Ceci indique l'importance d'ADAMTS-5 dans la dégradation du cartilage (Glasson *et al.* 2005; Stanton *et al.* 2005).

1.2.5.1.3 Les cathepsines

Les cathepsines sont des protéinases lyzomales présentes dans le cartilage. En conditions acides (pH 5) elles ont la capacité de dégrader les PG de la MEC (Ali *et al.* 1967; Sapolsky *et al.* 1973). La principale isoforme retrouvée dans le cartilage articulaire est la cathepsine D. Bien que le pH du cartilage arthrosique soit neutre, son activité est largement augmentée en condition arthrosique. Cela indique que la dégradation des PG du cartilage à pH physiologique est peu susceptible d'être

médiée par les cathepsines, mais plutôt par d'autres protéinases neutres (Sapolsky *et al.* 1973; Woessner 1973).

1.2.5.2 Les médiateurs de l'inflammation

En plus des enzymes de dégradation, d'autres facteurs inflammatoires prennent part activement à la dégradation du cartilage. Ces derniers incluant des cytokines, des prostaglandines, des gaz ou des ions seront abordés ci-dessous.

1.2.5.2.1 *Les cytokines*

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle central dans la pathogenèse de l'arthrose (Martel-Pelletier *et al.* 1999). L'implication de ces cytokines (IL-1, IL-6, TNF) engagées dans le catabolisme du cartilage est discutée ci-dessous.

Interleukine-1 (IL-1)

L'un des membres les plus décrits du groupe de cytokines pro-inflammatoires est l'interleukine-1 (IL-1). L'IL-1 est une famille comprenant 11 membres, les plus étudiées étant les formes α et β (Dinarello 2011). Le chondrocyte est la principale cible cellulaire de l'IL-1 β dans l'articulation grâce à l'expression à sa membrane de son récepteur (l'IL-1R). En condition pathologique, l'expression de l'IL-1R est augmentée (Daheshia and Yao 2008). Une fois liée à son récepteur, l'IL-1 peut initier l'activation des voies de signalisation cellulaire dont les principales sont les voies du *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) et des *mitogen activated protein kinases* (MAPK). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine semble également impliquée dans la pathogénie de l'arthrose. Le rôle de ces voies est un aspect important de la physiopathologie de l'arthrose. En effet, ces dernières sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques et jouent un rôle critique dans la régulation d'un grand nombre de gènes impliqués notamment dans la dégradation du cartilage (MMPs) et l'inflammation liée à l'arthrose (Berenbaum 2004). Les principales voies activées sont abordées ci-dessous.

La voie NF- κ B : Le facteur NF- κ B est une famille composée de 5 membres principaux: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB et c-Rel. En l'absence de stimulus, ces protéines se trouvent associées à des protéines inhibitrices (I κ B) dans le cytoplasme. En réponse à une activation, notamment par l'IL-1, I κ B kinase (IKK) phosphoryle et ubiquitine I κ B qui va ainsi être détruit par le protéasome, libérant ainsi les protéines NF- κ B. Ces protéines ainsi libérées vont former des complexes hétérodimériques (p50/p65) qui vont pouvoir librement, par translocation nucléaire, se diriger du cytoplasme vers le noyau. Le complexe p50/p65 après avoir migré dans le noyau peut se fixer sur des sites spécifiques au niveau des promoteurs de gènes cibles. La transcription génique médiée par NF- κ B est également régulée par des modifications post-transcriptionnelles. Ceci est la voie canonique d'activation de NF- κ B. Cependant il existe une voie non-canonique. Cette voie, est activée par

protéolyse de la protéine p100 qui permet ainsi la formation d'un dimère p52/RelB sous le contrôle d'IKK (Figure 9) (Jost and Ruland 2007).

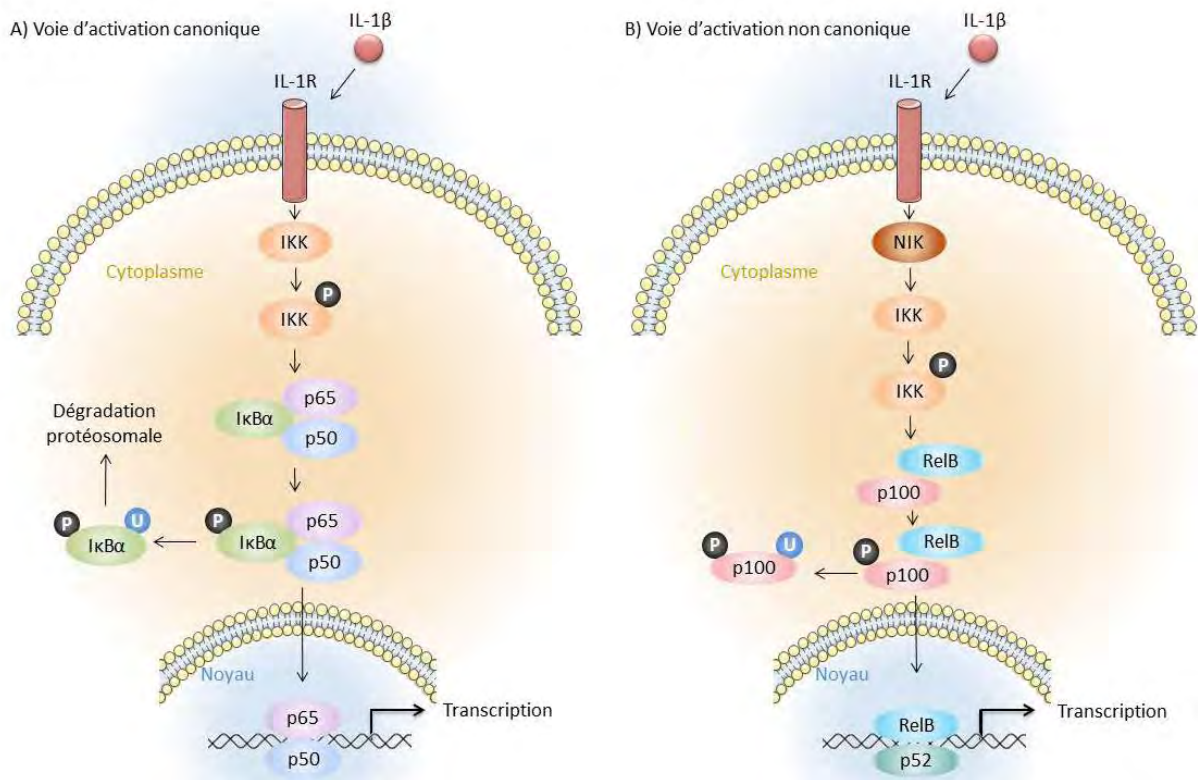


Figure 9 : Les voies d'activations classique et alternative de NF-κB. Inspirée de Jost *et al.*, 2007 (Jost and Ruland 2007).

La voie MAPK : L'activation de cette voie nécessite l'activation d'une protéine Ras, à l'origine d'une cascade de phosphorylations de sérine et thréonine médiées par des kinases. Succinctement, en réponse à un stimulus extracellulaire, une MAP kinase kinase kinase (MAP3K) phosphoryle une MAP kinase kinase (MAP2K) qui à son tour phosphoryle une MAPK qui est transloquée au noyau et phosphoryle alors des facteurs de transcription. Certains facteurs de transcription sont présents constitutivement dans le cytoplasme et peuvent aussi être phosphorylés par une MAPK puis entrer dans le noyau. Chez les mammifères six groupes de MAPK ont été identifiés : ERK1/2, c-Jun N-terminales (JNKs), p38, ERK3/4, ERK5 et enfin ERK7/8. Parmi ces groupes, seuls les trois premiers (ERK1/2, JNKs et p38) semblent impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose (Figure 10) (Jeffrey *et al.* 2007).

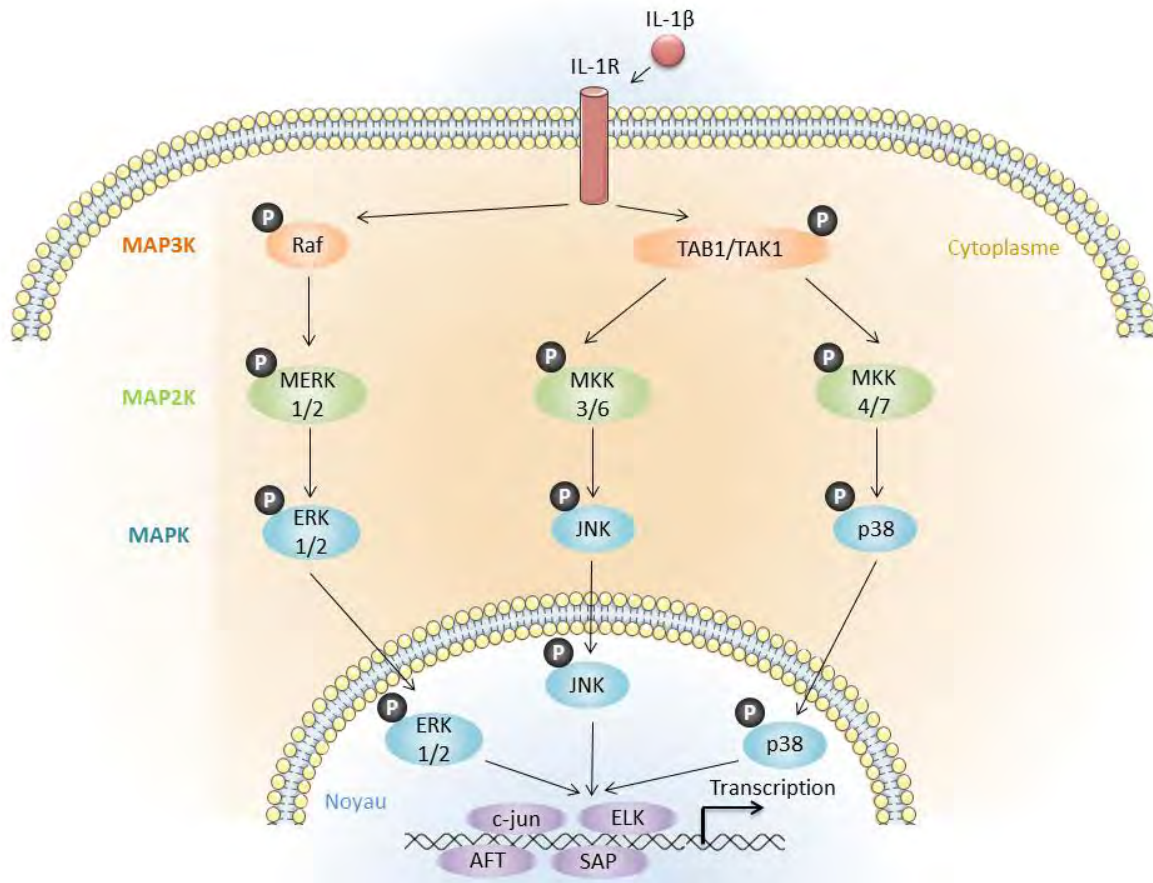


Figure 10 : Les principales voies d'activation des MAPKs.

L'IL-1 β se trouve en grande quantité dans le fluide synovial des articulations arthrosiques (Goldring 2002; Blom *et al.* 2007; Goldring *et al.* 2008). De multiples études utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* d'arthrose ont pu mettre en évidence le rôle clé de l'IL-1 β comme intermédiaire dans la perte de cartilage (Goldring 2000; Daheshia and Yao 2008). L'IL-1 β , va agir à plusieurs niveaux dans la pathogenèse de l'arthrose, ces différents axes sont développés ci-dessous.

Rôle dans la production d'enzymes protéolytiques : L'IL-1 β régule la plupart des enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation du cartilage (Blom *et al.* 2007; Daheshia and Yao 2008). Ainsi, dans des modèles *in vitro* de chondrocytes humains, la stimulation par l'IL-1 β provoque une expression et une production de MMP-1, MMP-3 et MMP-13 (Tetlow *et al.* 2001; Elliott *et al.* 2003; Fan *et al.* 2005; Inoue *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 2005). De plus, différentes études suggèrent que l'IL-1 β permet l'expression et la production d'ADAMTS-4 et 5 par les chondrocytes et les fibroblastes de la membrane synoviale (Dai *et al.* 2005; Fan *et al.* 2005; Cortial *et al.* 2006; Bondeson *et al.* 2007). Les MMPs et les ADAMTS ne semblent pas être les seules protéines de dégradation induites par l'IL-1 β , en effet une étude rapporte que la production de la cathepsine D est stimulée par l'IL-1 β dans un modèle de chondrocytes murins (Bao *et al.* 2014).

Rôle dans l'inflammation : L'IL-1 β a le pouvoir d'induire la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, facteurs angiogéniques) par les cellules hématopoïétiques environnantes. Des études rapportent par exemple qu'une stimulation des chondrocytes par l'IL-1 β mène à une synthèse du TNF- α , de la prostaglandine E2 (PGE₂) et de l'oxyde nitrique (NO), des médiateurs chimiques de l'inflammation (Daheshia and Yao 2008; Goldring *et al.* 2008).

Rôle dans la synthèse des composants de la MEC : L'IL-1 β inhibe la synthèse des composants de la matrice tels que les PG et le collagène de type II par les chondrocytes (Goldring *et al.* 1988; Stove *et al.* 2000; Goldring 2002; Stabellini *et al.* 2003; Pfander *et al.* 2004; Blom *et al.* 2007; Goldring *et al.* 2008; Shakibaei *et al.* 2008). Le principal effet est l'appauvrissement rapide des PG de la matrice, suivi plus tard par la destruction du réseau de collagène.

Rôle dans l'apoptose : plusieurs études ont démontré une augmentation de l'apoptose dans les chondrocytes sans doute liée à l'IL-1 β chez des patients arthrosiques (Daheshia and Yao 2008). L'IL-1 β semble réguler l'apoptose par une dépolarisation mitochondriale accompagnée d'une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Lopez-Armada *et al.* 2006). Toutefois, l'implication exacte de l'IL-1 β dans l'induction de l'apoptose reste encore méconnue. Aussi, la libération de NO induite par l'IL-1 β pourrait être le médiateur impliqué dans l'apoptose des chondrocytes (Daheshia and Yao 2008).

Interleukine-6 (IL-6)

En condition physiologique, le chondrocyte produit de faibles quantités d'IL-6. Toutefois, certaines cytokines et facteurs de croissance actifs en conditions pathologiques déclenchent sa production (Kapoor *et al.* 2011). L'IL-6 semble également contribuer au processus pathologique de l'arthrose par (i) l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires dans le tissu synovial (Guerne *et al.* 1989), (ii) la stimulation de la prolifération des chondrocytes et (iii) stimule l'augmentation des effets de l'IL-1 sur la synthèse des MMPs et l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes (Nietfeld *et al.* 1990). Outre son implication dans le processus arthrosique, l'IL-6 semble également moduler l'équilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques (Goldring 2000).

Le tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Le TNF- α a des propriétés analogues mais moins importantes que celles de l'IL-1 (Berenbaum 2000; Blom *et al.* 2007). Il est à noter qu'une augmentation de l'expression des récepteurs au TNF- α est localisée au niveau du cartilage arthrosique. Son implication dans la dégradation de la MEC passe par différents mécanismes : (i) une inhibition de la synthèse du collagène de type II, des protéines de liaison, du PG et (ii) la stimulation de la sécrétion de protéases (MMP-1, MMP-3 et MMP-13) (Saklatvala 1986; Lefebvre *et al.* 1990; Reboul *et al.* 1996). Bien qu'une activité de dégradation lui soit

attribuée, il semble davantage impliqué dans l'installation du processus inflammatoire (Westacott *et al.* 1994; Martel-Pelletier *et al.* 1999).

1.2.5.2.2 La prostaglandine E_2

La cyclooxygénase (COX) est une enzyme indispensable à la conversion de l'acide arachidonique (AA) en prostaglandine. Trois isoformes sont actuellement connues. La COX-1 est présente de façon constitutive dans de nombreux tissus et participe à leur homéostasie. En conditions physiologiques, l'expression de COX-2, quant à elle, n'est pas constitutive mais se fait rapidement en réponse à des stimuli tels que des cytokines pro-inflammatoires, des promoteurs tumoraux, des oncogènes et des facteurs de croissance (Crofford 1997; Vane *et al.* 1998; Martel-Pelletier *et al.* 2003). Une troisième COX a été identifiée et a été baptisée COX-3, elle possède une activité catalytique similaire à la COX-1 et la COX-2. COX-3 est exprimé le plus abondamment dans le cortex cérébral ainsi que dans le cœur (Chandrasekharan *et al.* 2002). Les prostaglandines sont des dérivés lipidiques engendrés à partir de l'AA de la membrane plasmique après activation des phospholipases A2 et de la COX-2 (Martel-Pelletier *et al.* 2003). Une augmentation de l'expression de COX-2 a été relevée chez les patients atteints d'arthrose (Amin *et al.* 2000; Chabane *et al.* 2008). Cette surexpression de COX-2 conduit à une production de prostanoïdes terminaux qui sont majoritairement des prostaglandines de type E_2 (PGE_2). La production de PGE_2 par les chondrocytes ou les synoviocytes est induite par un stimulus qui peut être l'IL-1 β ou encore le TNF- α (Amin *et al.* 2000; Martel-Pelletier *et al.* 2003) ou suite à un traumatisme (Chrisman *et al.* 1981). La PGE_2 exerce ses actions biologiques en se liant à un groupe de récepteur couplé aux protéines G. Ces récepteurs sont de quatre types : EP1, EP2, EP3 et EP4 (Hata and Breyer 2004; Sugimoto and Narumiya 2007). Les différentes fonctions attribuées aux PGE_2 sont présentées ci-dessous.

Rôle dans l'inflammation : PGE_2 est impliquée dans l'inflammation en stimulant l'expression de l'IL-1 β , qui amplifie le processus local d'inflammation via la production de médiateurs de l'inflammation (Martel-Pelletier *et al.* 2003).

Rôle dans la dégradation de la matrice : Le rôle de la PGE_2 dans la dégradation du cartilage est bien connu. En condition physiologique, la PGE_2 inhibe la synthèse de collagène, en revanche elle n'a aucune action sur la synthèse des autres constituants de la MEC (Amin *et al.* 2000). En revanche, une étude menée sur des explants de cartilage arthrosique montre que la PGE_2 augmente la dégradation du collagène de type 2 et inhibe la synthèse des PG et agrécanes (Attur *et al.* 2008). D'autre part, la PGE_2 stimule la production des MMPs dans des modèles de chondrocytes, synoviocytes et explants de cartilage (Amin *et al.* 2000; Martel-Pelletier *et al.* 2003; Attur *et al.* 2008). Ces effets cataboliques de la PGE_2 dans le cartilage seraient médiés par le récepteur EP4, surexprimé à la surface des chondrocytes arthrosiques (Attur *et al.* 2008). De plus, la PGE_2 serait impliqué dans le processus

d'apoptose médié par la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Miwa *et al.* 2000; Jeffrey and Aspden 2007).

1.2.5.2.3 Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO) également dénommé monoxyde d'azote est une molécule gazeuse qui joue le rôle de médiateur dans divers processus physiologiques et physiopathologiques (Xie *et al.* 1994). La molécule de NO est synthétisée à partir de la L-arginine et du dioxygène moléculaire (O₂). La réaction est catalysée par des enzymes, les NO synthases (NOS). Cette famille d'enzymes comprend trois isoformes : NOS neuronale (nNOS), NOS endothéliale (eNOS), et NOS inducible (iNOS) (Xie *et al.* 1994; Murrell *et al.* 1995; Lotz 1999; Fermor *et al.* 2007; Vuolteenaho *et al.* 2007). Les enzymes nNOS et eNOS sont exprimées de façon constitutive respectivement dans le système nerveux et dans les cellules endothéliales et les plaquettes. Elles produisent de faibles quantités de NO. Dans un contexte inflammatoire, iNOS est exprimée et le NO est produit de manière importante et prolongée. Une expression accrue d'iNOS et l'importante production de NO qui lui est associée ont été rapportées chez les patients atteints d'arthrose (Amin *et al.* 2000; Fermor *et al.* 2007; Vuolteenaho *et al.* 2007). Le NO est mesurable non seulement au niveau articulaire, dans le liquide synovial mais également dans les séra et les urines des patients arthrosiques (Lotz 1999; Amin *et al.* 2000; Vuolteenaho *et al.* 2007). Les cellules au repos expriment faiblement iNOS, en revanche un stimulus inflammatoire tel que l'IL-1, le TNF- α , le lipopolysaccharide (LPS), est nécessaire pour induire l'expression de iNOS (Xie *et al.* 1994; Murrell *et al.* 1995; Lotz 1999; Fermor *et al.* 2007; Vuolteenaho *et al.* 2007). La présence de NO chez ces patients suggère une implication de cette molécule dans la pathogenèse de l'arthrose. Ces multiples effets dans l'arthrose sont détaillés ci-dessous.

Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : L'effet destructeur du NO a principalement pour origine la réaction de liaison avec des anions superoxydes (O₂⁻) qui génère des espèces ROS. Les électrons libres portés par le NO et l'O₂ s'apparient pour donner le peroxyde nitrique (ONOO⁻), plus toxique (Lotz 1999; Fermor *et al.* 2007). La formation de ROS et la modification des voies de signalisation redox jouent un rôle important dans pathogenèse de l'arthrose (Henrotin *et al.* 2003).

Apoptose : La mort des chondrocytes est une caractéristique typique de l'arthrose. Des études ont mis en évidence une action directe du NO dans la mort des chondrocytes par apoptose (Blanco *et al.* 1995; Lotz 1999). Toutefois, l'action du NO sur l'initiation de l'apoptose n'est pas directe mais médiée par la production d'ONOO⁻ (Henrotin *et al.* 2003).

Synthèse de la matrice : Lorsque des fragments de cartilage sont traités avec un inhibiteur de NO (N^G-monoéthyl-L-arginine) cela restaure la synthèse des constituants de la matrice inhibée par l'IL-1. Ce qui indique que le NO est impliqué dans l'inhibition de la synthèse de la matrice (PG et collagène) médiée par l'IL-1 (Taskiran *et al.* 1994; Lotz 1999; Amin *et al.* 2000; Henrotin *et al.* 2003). Les

chondrocytes adhèrent à la matrice grâce à une protéine, la fibronectine. Le NO est capable d'empêcher l'interaction des chondrocytes avec la fibronectine, compromettant ainsi la capacité des chondrocytes à renouveler la MEC (Lotz 1999).

Production et activation des MMPs : Le NO est impliqué dans la régulation de la production de la collagénase (MMP-9) et dans l'activation de ses formes latentes. La régulation de la collagénase par le NO est indirecte, médiée par la production de ROS (Murrell *et al.* 1995; Lotz 1999; Henrotin *et al.* 2003).

Effet pro-inflammatoire : Dans l'arthrose, les chondrocytes et les synoviocytes régulent la réaction inflammatoire par des facteurs biochimiques tels que les cytokines (IL-1, TNF- α , IL-6), prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxane) et les ROS. Parmi les ROS, le NO participe à l'inflammation et à la dégradation du cartilage qui est associée (Henrotin *et al.* 2003).

Dégradation de la matrice : Les différents processus médiés par le NO détaillés ci-dessus mènent conjointement à terme à la dégradation de la matrice du cartilage.

1.2.5.2.4 *Le zinc*

Une étude récente révèle l'implication d'une nouvelle voie moléculaire dans la dégradation du cartilage. Cette voie moléculaire est celle du Zinc-ZIP8-MTF1. La protéine Zip8 permet le transport du zinc au sein des chondrocytes. Lorsque celle-ci est invalidée spécifiquement dans les chondrocytes chez la souris, une diminution de la destruction du cartilage induite par chirurgie est observée. De plus, il est mis en évidence que l'influx de zinc dans la cellule active la protéine *metal-regulatory transcription factor 1* (MTF1) qui régule les niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC. Ainsi, le zinc dirige l'expression des enzymes de destruction de la matrice MMP3, MMP9, MMP13 et ADAMTS5 dans les chondrocytes. Cela suggère que la dégradation de la MEC du cartilage par les enzymes est médiée par le niveau de zinc au sein des chondrocytes et donc par la voie de signalisation Zinc-ZIP8-MTF1 (Kim *et al.* 2014). Cette découverte pourrait ouvrir le champ à de nouveaux traitements de l'arthrose par inhibition pharmacologique de la fonction de la protéine Zip8 ou MTF1 spécifiquement dans les chondrocytes.

1.2.5.3 Les facteurs anaboliques du cartilage

À l'opposé des facteurs cataboliques du cartilage, il existe des facteurs responsables de l'activité anabolique des chondrocytes. Ces agents sont représentés par des facteurs de croissance tels que l'*insulin-like growth factor 1* (IGF-1) et le *transforming growth factor-beta* (TGF- β) ou les inhibiteurs de MMPs (TIMPs).

1.2.5.3.1 L'insulin-like growth factor (IGF)

L'insulin-like Growth Factor (IGF) est un polypeptide présentant, comme son nom l'indique, une séquence très proche de celles de l'insuline (Westacott and Sharif 1996; Schmidt *et al.* 2006). Il existe deux isoformes qui diffèrent par leur masse moléculaire : IGF-1 et IGF-2. Dans le contexte articulaire, la forme IGF-1 est la plus étudiée (Schmidt *et al.* 2006). L'IGF-1 est le principal facteur anabolique impliqué dans le cartilage articulaire. Il joue un rôle clé dans l'homéostasie du cartilage, l'équilibre entre la synthèse et la lyse des PG par les chondrocytes (Westacott and Sharif 1996; Saxer *et al.* 2001; Schmidt *et al.* 2006; Blom *et al.* 2007). A contrario, la synthèse et la dégradation des collagènes n'est pas régulée par IGF-1 (Schmidt *et al.* 2006).

1.2.5.3.2 Le transforming growth factor- β (TGF- β)

Le transforming growth factor-beta (TGF- β) est une superfamille de ligands impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires allant du développement embryonnaire au vieillissement. Dans le cartilage, les principaux représentants de cette superfamille sont le TGF- β et les *bone morphogenic proteins* (BMP). Ces derniers sont indispensables au maintien de l'homéostasie du cartilage et par conséquent sont impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose (Finnson *et al.* 2012; Bauge *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014). Leur rôle dans la stimulation des chondrocytes à produire des protéines de la matrice ainsi qu'une capacité à contrecarrer les effets délétères de l'IL-1 dans la dégradation du cartilage est bien connu (Blom *et al.* 2007; Finnson *et al.* 2012). Bien que l'action anabolique du TGF- β soit bien décrite, ce dernier est également impliqué dans la pathogenèse de l'arthrose. En effet, une étude récente souligne que des concentrations élevées de TGF- β 1 actif au niveau de l'os sous-chondral pourrait initier l'arthrose notamment en provoquant l'apparition d'ostéophytes et la dégradation du cartilage (Zhen *et al.* 2013).

1.2.5.3.3 Le tissue inhibitor of MMPs (TIMPs)

Les tissue inhibitors of MMPs (TIMP) sont, comme leur nom l'indique, des inhibiteurs naturels des MMP et de certains membres de la famille ADAMTS. Le chondrocyte produit quatre isoformes, numérotées de 1 à 4. Les MMP sont inhibées fortement par les 4 isoformes de TIMPs exceptées les MMP membranaires où seul TIMP-1 a une faible action. Les ADAMTS-4 et 5 quant à elles sont seulement inhibées par TIMP-3 (Troeborg and Nagase 2012). Les TIMP sont naturellement présents en excès par rapport aux enzymes de dégradation dans le cartilage sain ce qui permet de limiter la dégradation cartilagineuse (Smith 1999). Ils agissent en se liant de manière stœchiométrique aux MMP formant ainsi avec elles un complexe irréversible (Swarnakar *et al.* 2010). Ainsi, un déficit de TIMP joue un rôle important dans la dégradation de la MEC (Burrage and Brinckerhoff 2007; Clouet *et al.* 2009).

1.2.6 Prise en charge thérapeutique de l'arthrose

La prise en charge optimale de l'arthrose nécessite l'association d'une prise en charge non-pharmaceutique et pharmaceutique. Lorsque les traitements pharmaceutiques deviennent insuffisants, des traitements locaux tels que des injections intra articulaires peuvent être pratiquées. En dernier recours, des approches chirurgicales sont envisagées.

1.2.6.1 Non-pharmaceutique

L'OARSI a établi en 2014 ses recommandations dans la prise en charge des malades. Elles peuvent être classées en trois groupes : recommandé, incertain et non recommandé (McAlindon *et al.* 2014). Seuls les dispositifs recommandés seront abordés.

La balnéothérapie est l'ensemble des soins utilisant des bains d'eau thermale ou de mer, riche en minéraux. Ces traitements sont recommandés uniquement pour les personnes ayant plusieurs articulations affectées et comorbidités associées (McAlindon *et al.* 2014). Même si certains parlent d'effet placebo, pour beaucoup de patients les cures de balnéothérapie permettent de diminuer la douleur et la consommation de traitements pharmacologiques. Cependant des investigations plus rigoureuses devraient être menées afin de confirmer ces bienfaits (Falagas *et al.* 2009; Harzy *et al.* 2009; Sherman *et al.* 2009).

Il est communément reconnu, qu'une information adéquate et une éducation du patient sont indispensables dans sa prise en charge. L'information et l'éducation consistent à fournir au patient une information éclairée vis-à-vis de sa maladie et les modalités du traitement qu'il va subir (Bruyere *et al.* 2014). La majorité des études menées convergent vers la conclusion qu'un patient qui connaît bien sa pathologie, c'est-à-dire les facteurs aggravants, les complications ainsi que le traitement, aura tendance à mieux gérer sa maladie et donc à vivre mieux. L'éducation thérapeutique du patient souffrant d'arthrose porte généralement sur le traitement, l'activité physique, la perte de poids et le recours à du matériel médical. Ainsi, ces patients informés montrent une diminution de la douleur et une amélioration de la fonction articulaire (Fernandes *et al.* 2012; McAlindon *et al.* 2014).

Activité physique : plusieurs méta-analyses, ont mis en évidence une diminution de la douleur et une amélioration de la mobilité chez les malades faisant de l'exercice et des étirements. Les activités aquatiques apportent peu de bénéfices sur la douleur (McAlindon *et al.* 2014). Une méta-analyse récente répertoriant 31 études a évalué l'effet d'une activité physique à domicile sur les patients atteints d'arthrose du genou. Parmi ces études seules 17 ont un protocole expérimental jugé de qualité. Ces études ont toutes révélé qu'une activité physique pratiquée à domicile avec ou sans supervision du corps médical est recommandée dans la prise en charge de la gonarthrose (Anwer *et al.* 2015).

Les effets bénéfiques de la perte de poids ont été évalués dans quelques études. Ces dernières montrent qu'une perte de poids diminue le risque de développer une arthrose chez la femme, réduit les douleurs et améliore la mobilité. En dépit du faible lien décrit dans la littérature entre la perte de poids et la diminution de la prévalence de l'arthrose, l'ensemble des études est en accord et concluent qu'une perte de poids est à encourager dans la prise en charge de la maladie (Christensen *et al.* 2007; McAlindon *et al.* 2014).

Il existe peu de données dans la littérature sur les effets du matériel médical (cane, semelles orthopédiques, genouillères) dans la prise en charge de l'arthrose. Une étude menée en simple aveugle a démontré que l'utilisation de canne diminue la douleur et améliore la mobilité (Jones *et al.* 2012). Cependant, pour les patients présentant une arthrose multiple, l'utilisation de la canne est discutable et mérite de nouvelles investigations (McAlindon *et al.* 2014). Une seule revue suggère que le port de genouillère et de semelle orthopédique dissiperait la douleur, améliorerait la raideur articulaire, et la mobilité (Raja and Dewan 2011).

1.2.6.2 Pharmaceutique

Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de ralentir ou de traiter l'arthrose. Les différents traitements pharmacologiques proposés aux patients visent à diminuer les symptômes tels que la douleur, l'inflammation ainsi qu'à améliorer la mobilité. Les agents pharmacologiques oraux actuellement prescrits dans la prise en charge de l'arthrose peuvent être classés en deux catégories :

- Les traitements symptomatiques d'actions rapides, dits de « crise »
- Les traitements de fonds avec les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL)

1.2.6.2.1 *Les traitements symptomatiques d'action rapide*

1.2.6.2.1.1 Les antalgiques

Les antalgiques sont des agents pharmacologiques permettant de supprimer ou d'atténuer la douleur. Selon l'OMS, ils sont classés en trois paliers d'action croissante. Lorsque l'efficacité d'un antidouleur cesse, il est nécessaire de passer au palier supérieur (Tableau 3).

Palier I : Ce sont des médicaments dits périphériques car ils agissent localement. Dans cette catégorie se trouvent le paracétamol, l'acide acétylsalicylique et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) faiblement dosés. Ces agents sont prescrits en première intention car ils sont généralement très bien tolérés, et sont parmi les plus prescrits. Cependant, il est important de noter que les patients atteints d'arthrose présentent souvent des comorbidités, notamment des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires qui peuvent ainsi limiter l'utilisation de ces antalgiques. En effet, au regard des risques de toxicité cardiovasculaire encourus par rapport au faible pouvoir analgésique que confère le paracétamol, son utilisation dans le traitement symptomatique de l'arthrose est remise en

question. Ainsi il est recommandé d'utiliser le paracétamol à la dose efficace la plus faible et pendant une courte période (Richette *et al.* 2015).

Palier II : Ces médicaments sont mixtes, ils agissent à la fois au niveau périphérique et central (*i.e.* agissent sur le système nerveux central et périphérique). Ce groupe est représenté par le tramadol et la codéine, seuls ou en association avec du paracétamol. L'association du paracétamol, de l'opium et de la caféine est couramment prescrite. Il faut savoir que le tramadol, la codéine et l'opium sont des dérivés opioïdes. Utilisés à long terme, ils peuvent entraîner une dépendance psychique.

Palier III : Ce sont des agents centraux composés de la morphine et de ses dérivés. Ils sont utilisés en dernier recours et leur prescription doit se faire qu'après évaluation de la balance bénéfique/risque pour le patient surtout en cas de pathologies associées. Les patients âgés ont une moins bonne tolérance à la morphine, la posologie sera adaptée en fonction de chaque individu.

Tableau 3: Antalgiques prescrits dans le traitement de l'arthrose. POX : peroxydase ; COX : cyclooxygénase ; NA : noradrénaline ; 5-HT : sérotonine.

<i>Principe actif</i>	<i>Noms commerciaux</i>	<i>Mode d'action</i>	<i>Dose journalière recommandée</i>	<i>Dose maximale recommandée</i>	<i>Effets indésirables</i>
Paracétamol	Doliprane [®] , Dafalgan [®] , Efferalgan [®]	Inhibition de la POX	500mg à 1g/prise	4g	Allergie cutanée (rare)
Acide acétylsalicylique	Aspirine UPSA [®] , Aspegic [®]	Inhibition des COX	500 mg/prise	6g	Lésions du système gastro-intestinal, hémorragie, céphalées, vertiges, allergie
Tramadol	Contramal [®] , Topalgic [®]	Inhibe la recapture de NA et 5-HT	50 à 100mg/prise	400 mg	Troubles neuropsychiques, nausées, vomissements, somnolences, céphalées, vertiges, constipation
Codéine	Paderyl [®]	Agoniste pur des récepteurs impliqués dans la perception de la douleur	20 à 60mg/prise	300mg	Somnolences, étourdissements, vertiges, céphalées, nausées, vomissements
Morphine	Actiskenan [®] , Kapanol [®] , Moscontin [®]	Agoniste pur des récepteurs impliqués dans la perception de la douleur	Initiale de 5 à 10 mg/prise et augmentation progressive des doses	En fonction de la tolérance	Somnolences, vertiges, hallucinations, confusion, nausées, vomissements, constipation hypotension, dyspnées

1.2.6.2.1.2 Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) oraux sont généralement recommandés aux patients en cas de crise douloureuse résistante aux antidouleurs de palier I et aux anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL). Bien que l'arthrose ne soit pas systématiquement associée à une inflammation les AINS sont prescrits dans les deux cas de figure et permettent une réduction de la douleur et amélioration de la fonction articulaire. Les AINS sont efficaces mais parfois mal tolérés et causent des troubles gastro-intestinaux et hépatiques. Les inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) sont de plus en plus prescrits bien qu'ils soient délétères pour la muqueuse gastrique.

1.2.6.2.2 Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL)

Les AASAL sont des médicaments utilisés dans le cadre de traitements de fonds ou en prévention. Ils ont une action sur la douleur ainsi que le ralentissement de la maladie (Jordan *et al.* 2003; Bruyere *et al.* 2008; Clouet *et al.* 2009; Fidelix *et al.* 2014). Ils sont très bien tolérés avec peu d'effets secondaires et permettent ainsi de diminuer la consommation d'AINS. Ces agents ont une action progressive (début 4 à 6 semaines après le début du traitement) mais conservent leurs effets symptomatiques pendant une longue période (4 à 8 semaines après l'arrêt du traitement) (Hochberg and Dougados 2001). Il existe de nombreuses recommandations d'utilisation des AASALS, cependant les grandes organisations scientifiques dont elles émanent peinent à se mettre d'accord dans leurs conclusions (Tableau 4) (Cutolo *et al.* 2014; Nelson *et al.* 2014; Reginster *et al.* 2015). Plusieurs agents pharmacologiques oraux de cette catégorie sont actuellement sur le marché : la diacéréine, la glucosamine, la chondroïtine sulfate et les insaponifiables de soja et d'avocat.

Tableau 4: Recommandations d'utilisation des AASAL oraux. OARSI: Osteoarthritis Research Society International; GlcN : glucosamine ; CS : chondroïtine sulfate; IAS: Insaponifiables d'avocat et de soja; ACR : American College of Rheumatology; EULAR: European league against rheumatism; ESCEO: European society for clinical and economics aspects of osteoporosis and osteoarthritis.

Niveau	Nom de l'organisation	Localisation arthrose	Année	Recommandations	Références
International	OARSI	genou	2014	Diacéréine: incertain GlcN et CS: soulagement des symptômes: incertain; modification de la maladie: non IAS: incertain	(McAlindon <i>et al.</i> 2014)
	ACR	genou, hanche, main	2012	Diacéréine et IAS: pas de recommandation GlcN et CS: non	(Hochberg <i>et al.</i> 2012)
Européen	EULAR	genou, hanche, main	2003 (genou), 2005 (hanche), 2007 (main)	Diacéréine et IAS : probable (genou); non (hanche et main) GlcN: oui (genou); non (hanche et main)	(Jordan <i>et al.</i> 2003; Zhang <i>et al.</i> 2005; Zhang <i>et al.</i> 2007)
	ESCEO	genou	2014	CS: oui (genou); non (hanche et main) Diacéréine et IAS: non GlcN et CS: oui	(Bruyere <i>et al.</i> 2014)

La diacéréine est un dérivé semi-synthétique d'antraquinone extrait de plantes. Actuellement, deux méta-analyses ont été menées sur les effets de la diacéréine dans le traitement de l'arthrose. Ces deux études recouvrent respectivement 19 et 10 études sur la période de 1985 à 2009. Ces études concluent toutes deux à un effet bénéfique faible mais significatif dans le traitement de l'arthrose. La diacéréine diminue la douleur, en comparaison au placebo. Les effets bénéfiques sur la mobilité sont quant à eux contradictoires (Rintelen *et al.* 2006; Fidelix *et al.* 2014). La diarrhée est le principal effet secondaire de la diacéréine (touche environ 25% des patients), cet effet est lié à sa structure anthraquinonique, proche des laxatifs stimulants. Récemment, le CMD¹ recommande de limiter l'utilisation de médicaments contenant de la diacéréine afin de restreindre les risques de diarrhée grave et les effets hépatiques délétères. La diacéréine est commercialisée depuis 1992, initialement sous les noms ART 50[®] et ZONDAR[®] sous forme de gélules, et depuis est vendue sous forme de générique par de nombreux laboratoires pharmaceutiques.

La glucosamine (GlcN) est un glucide provenant du cartilage, de la carapace des arthropodes et des cuticules. C'est un précurseur naturel des GAG qui stimule leur synthèse ainsi que celle des autres constituants de la MEC (Derfoul *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2012). Bien qu'elle soit d'origine naturelle, la GlcN relève de la législation du médicament en Europe à l'exception du Royaume Uni où elle est considérée comme un complément alimentaire (Hochberg and Dougados 2001; Jordan *et al.* 2003). Les études évaluent son effet sous sa forme sulfatée (S) ou hydrochloride (HCl). La collaboration Cochrane[®] a établi en 2009 une revue des 25 études cliniques randomisées étudiant les effets et la toxicité de la GlcN. Cette étude démontre une sécurité d'utilisation comparable au placebo. Concernant les effets, les auteurs concluent à deux niveaux : la GlcN dite Rotta² a un effet supérieur au placebo sur la douleur et l'altération fonctionnelle liées à l'arthrose (15 études) en revanche, la GlcN non Rotta ne peut revendiquer ces mêmes allégations (10 études) (Towheed *et al.* 2005). Les effets symptomatiques de la glucosamine varient considérablement en fonction de la formulation utilisée et de la qualité des études cliniques (Towheed *et al.* 2005; Henrotin *et al.* 2012). De potentiels effets secondaires de la GlcN ont été rapportés. Les effets indésirables sont rares, les plus fréquents sont des sensibilité et/ou douleurs épigastriques, brûlures d'estomac, diarrhée et nausées. La GlcN peut également provoquer des réactions allergiques chez les patients souffrant d'allergies aux fruits de mer. De plus, la GlcN peut interagir avec divers produits pharmaceutiques, tels que la warfarine (Coumadine) et les médicaments contre le diabète, modifiant dangereusement leur efficacité (Christiansen *et al.* 2015). Par conséquent, l'utilisation de la GlcN dans la prise en

¹ CMD (h) est l'abréviation de "Coordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures (human)". C'est un organisme réglementaire représentant les Etats membres de l'union Européenne qui œuvre pour la législation des médicaments.

² Glucosamine sulfate provenant de l'industrie pharmaceutique italienne Rotta Pharma.

charge pharmaceutique de l'arthrose est largement remise en question. La GlcN est commercialisée sous forme de sel de sulfate ou de chlorhydrate et présente différentes formes galéniques (gélules, comprimés, sachets), dosée à 750 (Flexea[®], Structoflex[®] et Voltaflex[®]) ou 1500 mg (Dolenio[®] et Osaflexan[®]).

La chondroïtine est l'un des principaux constituants de la MEC du cartilage. Les formes commercialisées sont extraites de cartilage de différentes espèces (requin, poisson, bovin,...) (Clouet *et al.* 2009). La forme sulfatée (CS) est la seule étudiée. La CS est très bien tolérée (Uebelhart 2008). Des études ont démontré un effet antalgique supérieur de la CS par rapport aux AINS. La balance bénéfiques/risques de la CS est ainsi d'autant plus avantageuse que celle des AINS au regard des effets indésirables qu'ils engendrent (Henrotin *et al.* 2014). Toutefois, l'hétérogénéité et la qualité de ces études est remise en question (Zhang *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007; Hochberg *et al.* 2012; McAlindon *et al.* 2014). Récemment, l'association de la CS et de la GlcN a également été étudiée dans trois études. Les conclusions de ces études suggèrent que l'association de GlcN et CS aurait un effet antalgique, une diminution de la perte de cartilage et une diminution du pincement interarticulaire (Clegg *et al.* 2006; Sawitzke *et al.* 2010; Fransen *et al.* 2014; Martel-Pelletier *et al.* 2015). Deux de ces études ont démontré un effet bénéfique de l'association de ces deux molécules en comparaison avec leur utilisation seule (Clegg *et al.* 2006; Sawitzke *et al.* 2010; Fransen *et al.* 2014). La CS existe sous forme de gélules ou de sachets dosés à 400 mg chacun sous le nom de Chondrosulf[®]. Elle existe également sous forme de sulfate de chondroïtine sodique conditionné dans des gélules dosées à 500mg appelée Structum[®].

Les insaponifiables d'avocat et de soja (IAS) sont un extrait végétal formé par la fraction insoluble huileuse d'avocat et de soja (environ 1%) obtenue après saponification. Cet extrait est constitué de 1/3 d'avocat et 2/3 de soja. Le phytostérols β -sitostérol, le camperostérol et le stigmastérol sont les trois composants majeurs des IAS, cependant sa composition exacte est actuellement inconnue (Christiansen *et al.* 2015). Sur le plan clinique, six études ont été conduites. Les IAS permettraient de réduire la douleur et la raideur, tout en améliorant la fonction articulaire. De plus, les IAS sont des agents naturels à action lente qui ne traitent pas seulement la douleur aiguë, mais préviennent activement la progression des symptômes de l'arthrose (Blotman *et al.* 1997; Maheu *et al.* 1998; Appelboom *et al.* 2001; Ameye and Chee 2006; Pavelka *et al.* 2010; Maheu *et al.* 2014). La plupart des données méritent toutefois d'être étayées par des études de meilleure qualité méthodologique. Les IAS sont commercialisés sous forme de gélules, dosées à 300 mg sous le nom de Piasclédine[®].

1.2.6.2.3 Les traitements locaux

Lorsque les traitements pharmaceutiques oraux ne parviennent plus à soulager les patients, des injections locales peuvent être réalisées :

L'acide hyaluronique (AH) un GAG de haut poids moléculaire présent à la fois dans le cartilage et le liquide synovial (Haq *et al.* 2003; Evaniew *et al.* 2014). Sa quantité et sa qualité (poids moléculaire), décroissent avec l'installation de l'arthrose ce qui justifie le recours à la viscosupplémentation en AH. Cette technique est employée dans les gonarthroses résistantes aux traitements pharmacologiques oraux. Cela consiste en une injection intra articulaire d'AH qui a pour but de restaurer les fonctions biomécaniques et biochimiques du liquide synovial normal (Evaniew *et al.* 2014). Il existe plusieurs préparations disponibles sur le marché qui diffèrent par leur poids moléculaire, la méthode de production, la demi-vie et le coût (Haq *et al.* 2003; Evaniew *et al.* 2014). La plupart de ces traitements nécessite 3 à 5 injections. Les bienfaits de ce traitement sont progressifs et apparaissent 3 à 5 semaines après le début du traitement et perdurent 12 mois (Haq *et al.* 2003). Bien que de nombreuses études montrent une amélioration de l'état général du malade et de la fonction articulaire qui entraîne une antalgie, l'utilisation de l'AH reste controversée (Bellamy *et al.* 2006; Evaniew *et al.* 2014). Le bénéfice de l'AH est qualifié d'incertain par l'OARSI qui juge son effet insuffisant au vue des risques encourus (McAlindon *et al.* 2014).

Les corticoïdes sont des anti-inflammatoires stéroïdiens. Les infiltrations consistent en l'injection intra articulaire de corticoïdes. Elles sont prescrites en cas de crise douloureuse uniquement. Certaines études suggèrent une meilleure efficacité lors de la présence d'un épanchement de synovie, qui témoigne d'une inflammation sous-jacente probablement associée à une altération du cartilage. Leurs effets sont limités dans le temps, les bénéfiques sont ressentis pendant 2 à 4 semaines (Haq *et al.* 2003). Cette technique est recommandée par l'OARSI, cependant d'autres solutions thérapeutiques sont à envisager pour des douleurs prolongées (McAlindon *et al.* 2014).

1.2.6.3 Les traitements chirurgicaux

Le recours à la chirurgie intervient lorsque les stratégies thérapeutiques détaillées précédemment se révèlent insuffisantes. Dans le but de dissiper les symptômes relatifs à l'arthrose, des techniques de débridement et de lavages ont été proposés, cependant elles ne permettent pas de retarder la progression de la maladie (Hunziker 2002; Haq *et al.* 2003). Des techniques restauratrices telles que la mosaïcplastie, où des greffes de cartilage sain ont également montré de bons résultats (Brittberg *et al.* 1994; Tyyni and Karlsson 2000; Hangody and Fules 2003; Peterson *et al.* 2010). Cependant ces approches sont coûteuses et ne sont pas indiquées en première intention pour le traitement des défauts cartilagineux du genou. Toutefois, la pose de prothèse reste la solution ultime d'une arthrose avancée incurable (Hunziker 2002; Haq *et al.* 2003).

1.2.6.4 Les approches innovantes : l'ingénierie tissulaire du cartilage

L'ingénierie tissulaire du cartilage connaît un intérêt croissant au cours des dernières années en réponse au désert thérapeutique curatif qui entoure l'arthrose. L'ingénierie tissulaire associe les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus (Langer and Vacanti 1993). Deux approches sont développées en ingénierie tissulaire du cartilage. La première consiste à générer *in vitro* un tissu fonctionnel qui sera par la suite implanté. La seconde approche vise à implanter un tissu immature qui deviendra mature *in vivo* (Chen *et al.* 2006). Le principe de l'ingénierie tissulaire est donc d'associer une matrice biocompatible (ou biomatériau), des cellules et des molécules biologiques actives permettant la différenciation et la maturation cellulaires (les morphogènes) (Ateshian 2007). Le choix de ces différents paramètres constitue les enjeux de l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Le choix de la composante cellulaire est conditionné par la nécessité de régénérer une MEC aux propriétés biochimiques et biomécaniques les plus proches possibles de celles du tissu à remplacer. De plus, la source idéale de cellules doit être facilement prélevable et en quantité adaptée. Plusieurs sources sont étudiées à ce jour dont les chondrocytes, les CSM adultes, embryonnaires ou pluripotentes induites (iPS) (Chung and Burdick 2008).

L'application en clinique humaine des chondrocytes pour traiter les lésions cartilagineuses a pour la première fois été réalisé par Brittberg *et al.* en 1994 (Brittberg *et al.* 1994). Cette méthode consiste à prélever des chondrocytes autologues en zone saine et non portante et à les implanter après une étape d'amplification *in vitro*. L'implantation autologue de chondrocyte (ACI) présente des résultats satisfaisant à courts et moyen terme (1 à 9 ans): une diminution de la douleur, une nette amélioration des fonctionnalités ainsi que la formation d'un tissu de type hyalin (Peterson *et al.* 2010). Les nouvelles générations d'ACI associent les chondrocytes à un biomatériau. Ces biomatériaux apportent un environnement tridimensionnel aux chondrocytes, favorisant ainsi le maintien du phénotype chondrocytaire.

Les cellules stromales multipotentes (CSM) peuvent être isolées en grande quantité à partir de nombreux tissus tels que la moelle osseuse et le tissu adipeux adultes et présentent l'avantage de pouvoir être utilisées dans des conditions autologues. L'utilisation des CSM semble être une solution intéressante pour dépasser les limites liées au prélèvement et à l'amplification des chondrocytes (Filardo *et al.* 2013). Dans le cas d'atteintes arthrosiques, la stratégie semble s'orienter sur l'implantation de CSM, en se fondant sur leurs propriétés sécrétrices. En effet, les CSM ont la capacité de moduler leur environnement, en sécrétant un large spectre de molécules bioactives, regroupées sous le terme de sécrétome. La sécrétion de ces facteurs peut avoir des effets immunorégulateurs, angiogéniques, anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et anti-apoptotiques. Ces

propriétés ont d'ailleurs montré leur efficacité lors d'études cliniques chez l'homme (Wakitani *et al.* 2002; Centeno *et al.* 2008; Centeno *et al.* 2008).

1.2.7 Les modèles animaux d'arthrose

L'objectif principal des modèles animaux d'arthrose est de mimer l'évolution et la progression de la maladie dans le but de reproduire les symptômes de la pathologie humaine (dégradation du cartilage, atteintes osseuses, inflammation). Ces modèles permettent d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements. L'arthrose étant une maladie hétérogène, il est important de posséder différents outils permettant de reproduire expérimentalement les différents types d'arthrose. Il existe de nombreux modèles animaux mimant une arthrose, ces derniers sont présentés ci-dessous.

1.2.7.1 Les modèles naturels

Les modèles dits naturels sont des modèles présentant une arthrose sans intervention chirurgicale ou injection chimique. Cela peut être des animaux génétiquement modifiés ou alors présentant naturellement une arthrose au cours du vieillissement. Ces modèles ont l'avantage de reproduire une arthrose liée au vieillissement et génétique très proche de la maladie humaine.

1.2.7.1.1 Les modèles génétiquement modifiés

Chez la souris, la souche STR / 1N est génétiquement prédisposée à développer une grave instabilité du genou qui conduit à une perte de cartilage articulaire (Schunke *et al.* 1988). Actuellement, le modèle génétiquement modifié le plus répandu est la souris STR/Ort qui est dérivé de la souche STR/1N. Ces animaux présentent les premiers signes d'arthrose dès 6 mois. Les inconvénients du modèle de souris STR/Ort sont l'absence de la composante inflammatoire retrouvée dans la pathologie humaine et la présence de problèmes métaboliques associés (surpoids, hyperlipidémie et hyper-insulinémie) pouvant induire un biais dans l'étude de la maladie (Gaffen *et al.* 1995; Mason *et al.* 2001; Uchida *et al.* 2009; Watanabe *et al.* 2010).

1.2.7.1.2 Les modèles liés à l'âge

Certaines espèces animales, la plupart du temps des souches spécifiques de souris et de cobayes, et de chiens développent spontanément la maladie en vieillissant. Ces animaux ont l'avantage de reproduire étroitement le développement clinique de la maladie humaine (Little and Smith 2008).

La souche de souris C57/Bl6 est connue pour présenter des anomalies des surfaces articulaires fémorales et rotuliennes dès l'âge de 2 mois et demi qui s'accroissent avec le temps. Cette altération de la surface articulaire est un événement précoce dans la dégénérescence arthrosique (Stanescu *et al.* 1993). Les cobayes développent aussi une arthrose multiple spontanément dont les premiers signes se font ressentir dès l'âge de trois mois (Bendele 2001). La souche Dunkin-Hartley (DH) est le

modèle le plus souvent utilisé dans les études de l'arthrose, même si la progression de la pathologie est plus rapide que dans la souche Gohi / SPF aussi concernée par de l'arthrose liée à l'âge (Wang *et al.* 2011; Gregory *et al.* 2012). Bien que le modèle d'arthrose induite chez le chien soit un des modèles les plus courants, certaines races de chiens sont connues pour développer une arthrose spontanément en vieillissant (*e.g.* Beagles) (Liu *et al.* 2003). De plus, certaines races de chiens possèdent des prédispositions génétiques de développer de l'arthrose à un âge plus précoce. Par exemple, les Labrador Retrievers qui présentent une dysplasie de la hanche peuvent développer une arthrose dès l'âge de 2 ans (Burton-Wurster *et al.* 1999).

1.2.7.2 Les modèles induits par chirurgie

La chirurgie est la technique la plus utilisée pour mimer l'arthrose. Ces modèles ont l'avantage de reproduire une arthrose post-traumatique comparable à la pathologie humaine. Les autres avantages de cette technique sont une incidence de 100% et une apparition des lésions rapide. En revanche, la chirurgie doit être menée avec précaution chez le petit animal afin de prévenir des dommages collatéraux causés par l'acte chirurgical. Ces techniques vont générer une contrainte mécanique de charge sur une articulation déstabilisée ce qui conduit finalement à des lésions arthrosiques. La section du ligament croisé antérieur (*anterior cruciate ligament transection* (ACLT)) (Figure 11) et la ménisectomie sont les deux principales procédures utilisées pour induire l'arthrose *in vivo*. La section du ligament croisé antérieur est adaptée aussi bien aux petits qu'aux grands mammifères (Chen *et al.* ; Killian *et al.* 2010; Aktas *et al.* 2011). La ménisectomie quant à elle peut être partielle ou totale, ce qui aura un impact sur la gravité des lésions. La déstabilisation médiale du ménisque (DMM) est une autre procédure chirurgicale qui consiste en la section du ligament ménisquo-tibial médial (ligament reliant le ménisque au plateau tibial) (Figure 11). Tout comme la section du ligament croisé, cette chirurgie conduit à des lésions de la région tibiale cependant moins sévères et plus progressives (Glasson *et al.* 2007). Un modèle récent chez le chien consiste à réaliser des lacérations superficielles sur le condyle fémoral. A la suite de l'acte chirurgical, les chiens sont forcés à exercer une activité physique quotidienne. Cette procédure provoque une arthrose lente et progressive, idéale pour étudier l'efficacité d'un traitement (Marijnissen *et al.* 2002; Sniekers *et al.* 2008). Ces différentes techniques chirurgicales peuvent être couplées et créer ainsi un modèle d'arthrose plus sévère. Outre l'acte chirurgical, la gravité des lésions peut être modulable en fonction du temps d'induction.

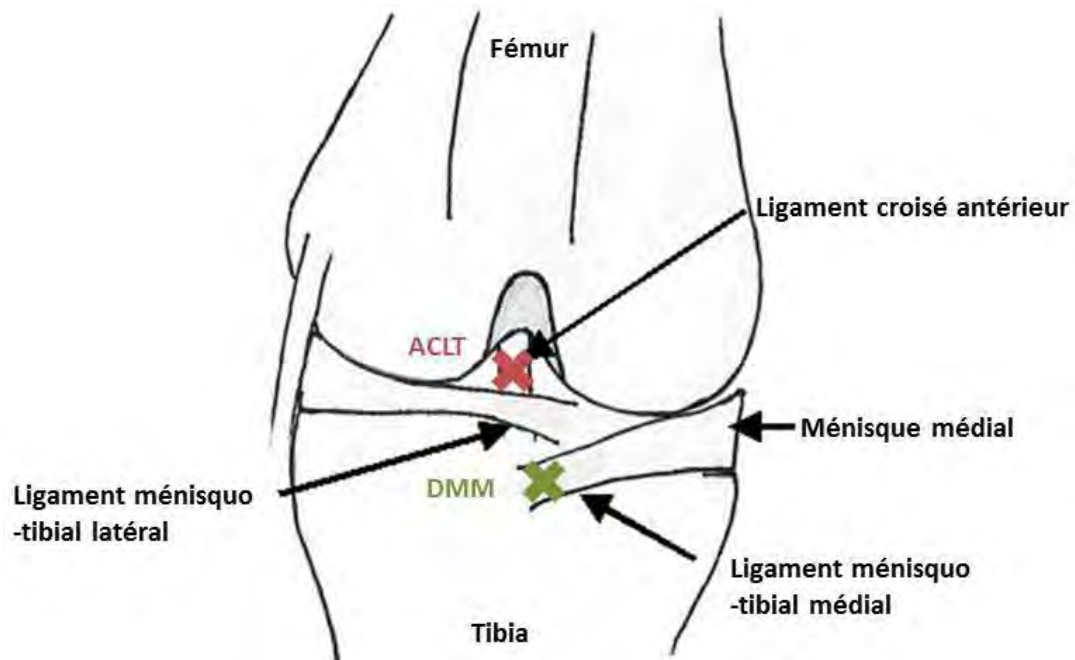


Figure 11 : Schéma frontal d'une articulation et de ses ligaments. Le ligament ménisquo-tibial médial est sectionné pour générer une DMM. Le ligament croisé antérieur est sectionné dans le modèle ACLT. Modifié d'après Glasson *et al.*, 2007 (Glasson *et al.* 2007).

1.2.7.3 Induits chimiquement

L'injection intra-articulaire de molécules actives telles que des cytokines (IL-1 β , TNF- α), des enzymes (papaïne, la collagénase) ou des produits chimiques (mono-iodoacétate (MIA)) induit des changements pathologiques similaires à l'arthrose. Ces lésions peuvent être modulées par la dose administrée et le temps d'induction. Cela est particulièrement vrai pour le MIA, un inhibiteur de la glycolyse aérobie qui provoque la mort des chondrocytes associée à une douleur articulaire assez semblable à la pathologie humaine (Bendele 2001). Les lésions induites par des injections de telles molécules sont dose-dépendantes et ont la particularité d'être réversibles quand de faibles doses sont employées.

2. Les nutraceutiques

2.1 Définition et législation

Le terme nutraceutique est la contraction des mots « nutrition » et « pharmaceutique », ce sont des aliments considérés comme bénéfiques pour la santé » (Zeisel 1999). Plus précisément, les nutraceutiques sont des micronutriments isolés ou extraits de l'alimentation, d'animaux (*e.g.* de coquille de crustacés ou carapace) ou de plantes, présentés sous formes galéniques (comprimé, gélule,...) et ayant des effets bénéfiques sur la santé (Kalra 2003). Selon le dosage et les allégations, les nutraceutiques sont des préparations qui peuvent être considérées tour à tour comme cosmétiques, compléments alimentaires ou encore médicaments et relèvent donc de législations différentes. De ce fait, le terme nutraceutique n'a aucune valeur légale.

En Europe, la définition réglementaire des médicaments à usage humain est donnée dans la Directive 2001/83 du 6 novembre 2001 qui a depuis été modifiée par la directive 2004/27 du 31 mars 2004. La définition est la suivante:

Médicament par présentation : « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. »

Médicament par fonction : « toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou pouvant lui être administrée en vue de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit établir un diagnostic médical. »

On entend par complément alimentaire une « denrée alimentaire dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constitue une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seul ou combiné, commercialisée sous forme de dose ». Leur utilisation est régie par la Directive 2002/46/CE du 10 juin 2002, transposée en droit français le 20 mars 2006 par le décret n°2006-352. Depuis 2007, la France a adopté le règlement européen 1924/2006 visant à encadrer l'utilisation des allégations nutritionnelles et de santé. Cette réforme a pour objectif de clarifier la commercialisation au sein de l'UE et d'assurer la protection du consommateur. Depuis l'entrée en vigueur de ce texte, l'ENSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) est chargée de l'évaluation des allégations avant la mise sur le marché qui était avant gérée au niveau national par l'Agence française de sécurité des aliments (AFSSA) (qui est remplacée depuis 2010 par l'Agence nationale chargée de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). La Commission Européenne, quant à elle, liste les allégations autorisées à ce jour. Il existe deux catégories d'allégations:

L'allégation nutritionnelle : « toute allégation qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des propriétés nutritionnelles particulières de par :

- l'énergie (valeur calorique) qu'elle fournit, fournit à un degré moindre ou plus élevé ou ne fournit pas, par exemple « allégé en matières grasses ».
- et/ou les nutriments ou autres substances qu'elle contient, contient en proportion moindre ou plus élevée ou ne contient pas. » Par exemples les allégations « faible en matière grasse » ou encore « sans gluten » entrent dans ce cadre.

L'allégation santé : « toute allégation qui affirme, suggère ou implique l'existence d'une relation entre, d'une part, une catégorie de denrées alimentaires, une denrée alimentaire ou l'un de ses composants et, d'autre part, la santé ». Les allégations santé relèvent des articles 13 ou 14 du règlement 1924/2006. L'article 13 décrit ou mentionne des allégations de trois sortes :

- relative à la croissance, le développement, et les fonctions de l'organisme par exemple « favorise le transit intestinal ».
- relative aux fonctions comportementales et psychologiques tels que « favorise le sommeil », « calme les tensions ».
- relative à l'amaigrissement, le contrôle de poids, la réduction de la sensation de faim ou la réduction de la valeur énergétique du régime alimentaire, comme « réduit l'appétit » ou encore « favorise la perte de poids ».

Les allégations santé relevant de l'article 14 sont de deux sortes :

- le rôle des nutriments ou autres substances dans la réduction des facteurs de risque de maladie, par exemple « l'acide linoléique diminue le risque de maladies cardio-vasculaire ».
- le rôle de nutriments ou autres substances dans le développement et la croissance infantile tel que « contribue à l'éveil de l'enfant ».

A la lumière de ces données, une allégation telle que « le calcium prévient l'ostéoporose » entre dans le cadre de la prévention d'une maladie et relève législativement d'un médicament. Tandis qu'une allégation qui mentionne « le calcium participe à la construction osseuse » ou encore « le calcium diminue le risque d'ostéoporose » relève des articles 13 et 14, respectivement, du règlement 1924/2006 d'une allégation santé d'un complément alimentaire.

2.2 Classification des nutraceutiques

Il n'existe aucune classification officielle des nutraceutiques. Ces derniers peuvent être cependant classés selon leur nature et leur origine. Une proposition de classification pourrait être la suivante : les produits d'origine marine (glucosamine, chitosan, chondroïtine...), les vitamines et minéraux et

enfin les composés phénoliques. Ces différentes catégories peuvent faire l'objet d'allégations nutritionnelles ou de santé. Seuls les composés phénoliques seront détaillés ici.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure comprenant au moins un noyau aromatique (phénolique) substitué par un ou plusieurs groupements hydroxyles (Cermak 2008; Marin *et al.* 2015). Ces derniers peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non flavonoïdes, eux même subdivisés en sous-groupes (Figure 12). Les composés phénoliques sont largement dispersés dans le règne végétal et actuellement pas moins de 8000 structures phénoliques ont été décrites (Martinez-Valverde *et al.* 2000; Lecour and Lamont 2011). La nature et les quantités dépendent de l'espèce considérée et un composé phénolique est souvent caractéristique d'une espèce ou d'un organe particulier de cette plante. Les principales sources alimentaires des composés phénoliques sont les fruits, les légumes et les boissons (jus, vin, thé, café, chocolat) (Scalbert *et al.* 2002; Lecour and Lamont 2011; Ly *et al.* 2015). L'apport alimentaire journalier en composés phénoliques reste difficile à estimer du fait de la vaste diversité des composants présents, à laquelle s'ajoutent des teneurs différentes en fonction de la variété, du lieu de culture ou encore de la saison (Scalbert and Williamson 2000; Manach *et al.* 2004). Bien qu'il n'existe actuellement aucun apport journalier recommandé (AJR) pour les composés phénoliques, dans le cadre d'une alimentation variée et équilibrée, cet apport est estimé à 1g/ jour (Scalbert and Williamson 2000; Scalbert *et al.* 2002; Zujko *et al.* 2012). Cependant ces données sont très variables selon l'ethnicité et les coutumes alimentaires.

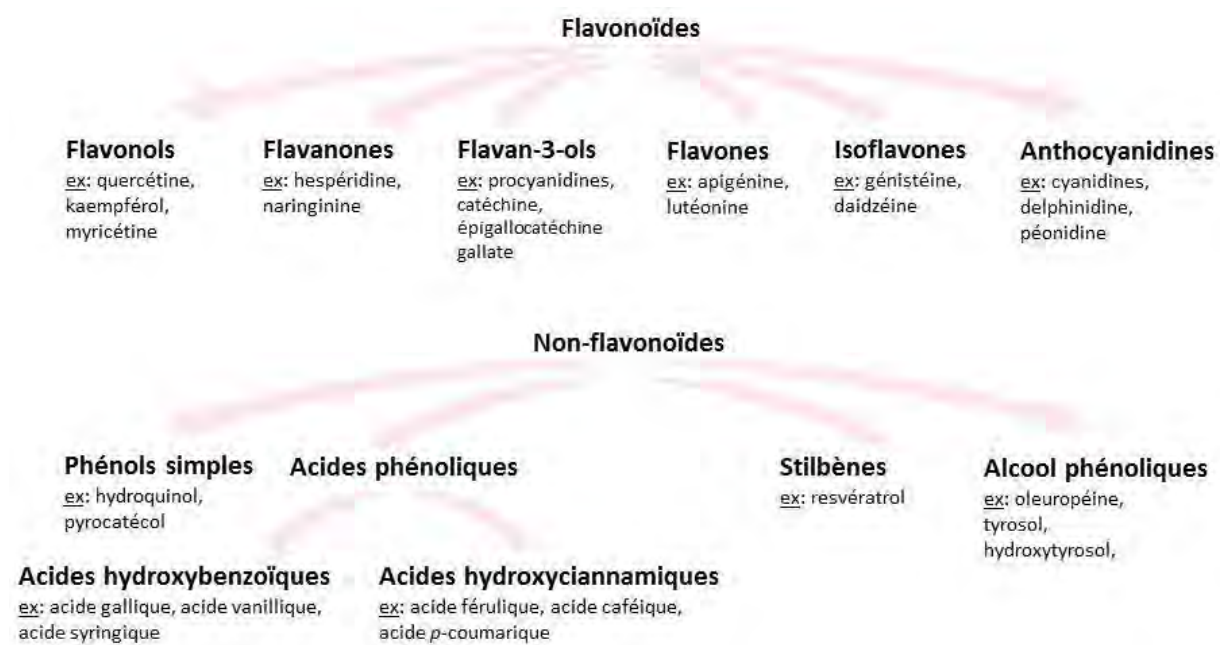


Figure 12 : classification des composés phénoliques.

2.3 Exemple du raisin et l'olive : deux fruits riches en polyphénols et aux nombreuses propriétés santé

L'intérêt pour le régime méditerranéen a explosé au cours des dernières années. Dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires, le cancer et le déclin lié à l'âge, il est recommandé de changer ses habitudes alimentaires en copiant le régime méditerranéen. Son succès est en partie dû à sa richesse en huile d'olive, en céréales, légumes et en fruits. L'alimentation du régime méditerranéen est synonyme d'une faible consommation de viandes, riches en acide gras polyinsaturés, et à une richesse en acide gras mono-insaturés d'origine végétale. Outre le régime méditerranéen, le « *French paradox* » établi un étonnant contraste entre une consommation en riche en graisses et une relative faible incidence des maladies cardiovasculaire et de cancer dans l'hexagone (Ferrieres 2004). Ainsi, la consommation modérée mais régulière de vin rouge a été désignée comme principal facteur pour tenter d'expliquer ce phénomène. Cet effet protecteur a été attribué à la fraction non alcoolique du vin et en particulier des composés phénoliques présents en grande quantité.

Au vu de ces données et dans le cadre d'une collaboration avec la société Grap'Sud nous nous sommes naturellement intéressés au raisin et à l'olive, deux fruits à la composition riche en composés phénoliques. Leur histoire, composition, leur métabolisme ainsi que leurs effets sur la santé seront détaillés ici.

2.3.1 Histoire et composition du raisin et de l'olive

2.3.1.1 Présentation du raisin

L'histoire du raisin débute 6000 ans avant J.C. et occupe de nos jours une place à part dans le monde occidental. La vigne a d'abord été présente à l'état sauvage en Asie Mineure qui a diffusé vers l'ouest jusqu'à l'Antiquité où les Grecs et les Romains répandirent sa culture dans tout l'Empire Romain. Il est maintenant cultivé sur tous les continents, dans les régions tempérées présentant des étés chauds et secs et des hivers doux (Georgiev *et al.* 2014). Riche en symbole, son principal produit, le vin, fût considéré comme divin et devint la figure du culte Dionysos pour les Grecs et de Bacchus pour les Romains (This *et al.* 2006). Si pendant longtemps le raisin était seulement utilisé comme matière première pour la production du vin, il serait arrivé sur nos tables au 16^{ème} siècle grâce à François 1^{er} et aurait été, pour l'anecdote, son dessert favori. Le raisin est de nos jours une des espèces végétales les plus importantes sur le plan économique en raison de la diversité de ses usages : raisin de table, vin, jus de raisin et autres produits dérivés.

Le raisin est un fruit qui contient de nombreux éléments nutritifs, tels que les vitamines, les minéraux, des glucides, des fibres et des composés phytochimiques. Les composés phénoliques sont les composés phytochimiques les plus importants du raisin du fait des nombreuses activités biologiques qui leur sont attribuées. Le raisin est très riche en composés phénoliques, principalement concentré dans les pépins, la peau, la tige et la feuille plutôt que dans la partie charnue du fruit (Pastrana-Bonilla *et al.* 2003; Makris *et al.* 2008). La concentration totale de composés phénoliques mesurée en équivalent en acide gallique est de 2178,8 mg/g dans les pépins, 374,6mg/g dans la peau, 23,8mg/g dans la tige et enfin 351,6 mg/g dans la feuille (Pastrana-Bonilla *et al.* 2003). Cependant, la teneur totale en polyphénol varie selon le type de raisin considéré, la composition du sol, le climat, l'origine géographique, et les pratiques de culture ou l'exposition à des maladies telles que les infections fongiques. Les principaux polyphénols du raisin et leurs distributions sont détaillés dans le tableau 5. Les deux groupes les plus représentés sont les anthocyanes (cyanidine, péonidine, pétunidine, malvidine) qui apportent la coloration violette/pourpre au raisin et les flavanes 3-ols (catéchines, épicatechine, procyanidines) qui sont des tanins responsable de l'astringence notamment des pépins.

Parmi les tanins, les procyanidines sont aussi présentes dans de nombreuses plantes sous forme de polymères avec un degré de polymérisation variant de 4 à 11. Les principales sources de procyanidines dans l'alimentation sont les fruits (pomme, poire, raisin) et dans les boissons (vin rouge, thé, chocolat) (Scalbert and Williamson 2000).

Tableau 5 : Principaux polyphénols du raisin et distributions.

<i>Distribution</i>	<i>Composés phénoliques</i>	<i>Références</i>
Pépins	Epicatéchine, catéchine, acide gallique, procyanidines	(Revilla and Ryan 2000; Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> 2003; Hernandez-Jimenez <i>et al.</i> 2009)
Peau	Acide ellagique, myricétine, quercétine, kaempférol, resvératrol, malvidine, quercétine rutéine, cyanidine, delphidine, péonidine, pétunidine, procyanidines	(Revilla and Ryan 2000; Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> 2003; Hernandez-Jimenez <i>et al.</i> 2009)
Tige	Quercétine 3-glucuronide, catéchine, acide caffeoyl-tartrique, astilbine,	(Souquet <i>et al.</i> 2000)
Feuille	Acide ellagique, kaempférol, myricétine, quercétine, acide gallique	(Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> 2003)
Pulpe	Acide caffeoyl-tartrique, catéchine, acide coumaroyl-	(Revilla and Ryan 2000)

tartrique

2.3.1.2 Présentation de l'olive

Depuis l'antiquité l'olivier est considéré comme symbole de paix et de sagesse. Sa culture s'étend tout le long du bassin méditerranéen jusqu'au nord de l'Iran, à l'extrémité sud de la mer Caspienne ainsi que l'Asie occidentale et Afrique du Nord (Ryan and Robards 1998). L'olive donne une huile aux nombreuses vertus. Elle était utilisée en médecine ancestrale pour guérir les blessures et certaines maladies, ainsi qu'en cosmétologie par le biais de la fabrication de savons. Sa saveur et ses nombreux bienfaits pour la santé font d'elle une des huiles les plus consommées aujourd'hui.

L'olive est un fruit riche en nutriments bénéfiques pour la santé tels que les composés phénoliques, les acides gras ou encore les minéraux. Les olives ne sont pas utilisées dans leur état naturel en raison de leur amertume mais plutôt consommées après transformation sous forme d'huile ou encore d'olive de table (Hashmi *et al.* 2015). Le composé phénolique le plus présent de l'olive est l'oleuropéine, suivi de près par son précurseur, l'hydroxytyrosol (El and Karakaya 2009). L'huile d'olive renferme en grande quantité des acides gras mono-insaturés comme l'acide oléique (Rossell 2001) qui la caractérise ainsi que des acides gras polyinsaturés représentés par l'acide linoléique, essentiel pour l'alimentation humaine (Visioli and Galli 1998). L'huile d'olive ne contient pas uniquement des acides gras, elle renferme également (i) des phénols simples, (ii) des secoiridoïdes et enfin (iii) des polyphénols de type lignanes et flavonols (De La Torre 2008). L'hydroxytyrosol, le tyrosol et leurs dérivés secoiridoïdes représentent environ 90% de la teneur en composés phénoliques totaux (de la Torre-Carbot *et al.* 2005). Bien que le contenu phénolique puisse varier considérablement, la concentration moyenne en hydroxytyrosol se situe entre 130 et 350 mg/kg dans l'huile d'olive vierge et peut atteindre 20g/kg dans l'olive (Marsilio *et al.* 2001). Les composés phénoliques principaux identifiés dans le fruit et l'huile sont détaillés dans le tableau 6.

Parmi ces composés phénoliques, l'hydroxytyrosol est celui qui présente les plus importantes activités biologiques.

Tableau 6 : Principaux polyphénols de l'olive et de son huile.

<i>Distribution</i>	<i>Composés phénoliques</i>	<i>Références</i>
Fruit	Oleuropéine, hydroxytyrosol, verbascoside, apigénine, lutéoline, rutéine, catéchine, tyrosol, vanilline, acide vanillique et acide caféique	(El and Karakaya 2009; Hashmi <i>et al.</i> 2015)
Huile	Hydroxytyrosol, tyrosol, acide vanillique, oleuropéine,	(De La Torre

2.4 Biodisponibilité des composés phénoliques: généralités

Les propriétés biologiques des nutraceutiques et en particulier des composés phénoliques dépendent de leur biodisponibilité, c'est-à-dire leur capacité à rejoindre la circulation sanguine ou les organes après administration. Une manière indirecte d'évaluer la biodisponibilité des composés phénoliques est d'évaluer la capacité antioxydante du plasma après consommation, cela constitue une preuve du passage des composés à travers la barrière intestinale. Une façon plus directe est de rechercher dans les fluides biologiques tels que le sérum ou l'urine les composés natifs ou leurs métabolites après ingestion (Scalbert and Williamson 2000). Des études de biodisponibilité ont montré que les concentrations plasmatiques maximales sont généralement atteintes 1 à 2 h après ingestion, excepté pour les composés phénoliques qui doivent être partiellement métabolisés par la flore colique avant leur absorption.

La biodisponibilité au sein des tissus cible des polyphénols ou de leurs métabolites se révèle beaucoup plus importante que leurs concentrations plasmatiques. Toutefois, ces données sont très rares dans la littérature. Seules quelques études ont évalué la distribution de composés phénoliques radiomarqués (quercétine, épigallocatechine gallate, quercétine 4'-glucoside et le resvératrol) après ingestion. Ces analyses ont montré qu'après 1 à 6h la radioactivité se situait essentiellement au niveau du sang et des tissus du système digestif (estomac, intestin, foie) (Ueno *et al.* 1983; Suganuma *et al.* 1998; Mullen *et al.* 2002; Swezey *et al.* 2003; Vitrac *et al.* 2003; Gester *et al.* 2005). Toutefois, des composés phénoliques ont été détectés par HPLC dans de nombreux tissus incluant le cerveau, les cellules endothéliales, le cœur, rein, rate, pancréas, utérus, ovaires, glandes mammaires, testicules, vessie, os et peau (Manach *et al.* 2004).

Après l'ingestion, les composés phénoliques subissent différentes étapes de transformation : l'absorption par les cellules intestinales, le métabolisme intestinal ou hépatique et enfin l'excrétion qui s'opère par voie biliaire ou urinaire (Scalbert and Williamson 2000; Scalbert *et al.* 2002) (Figure 13).

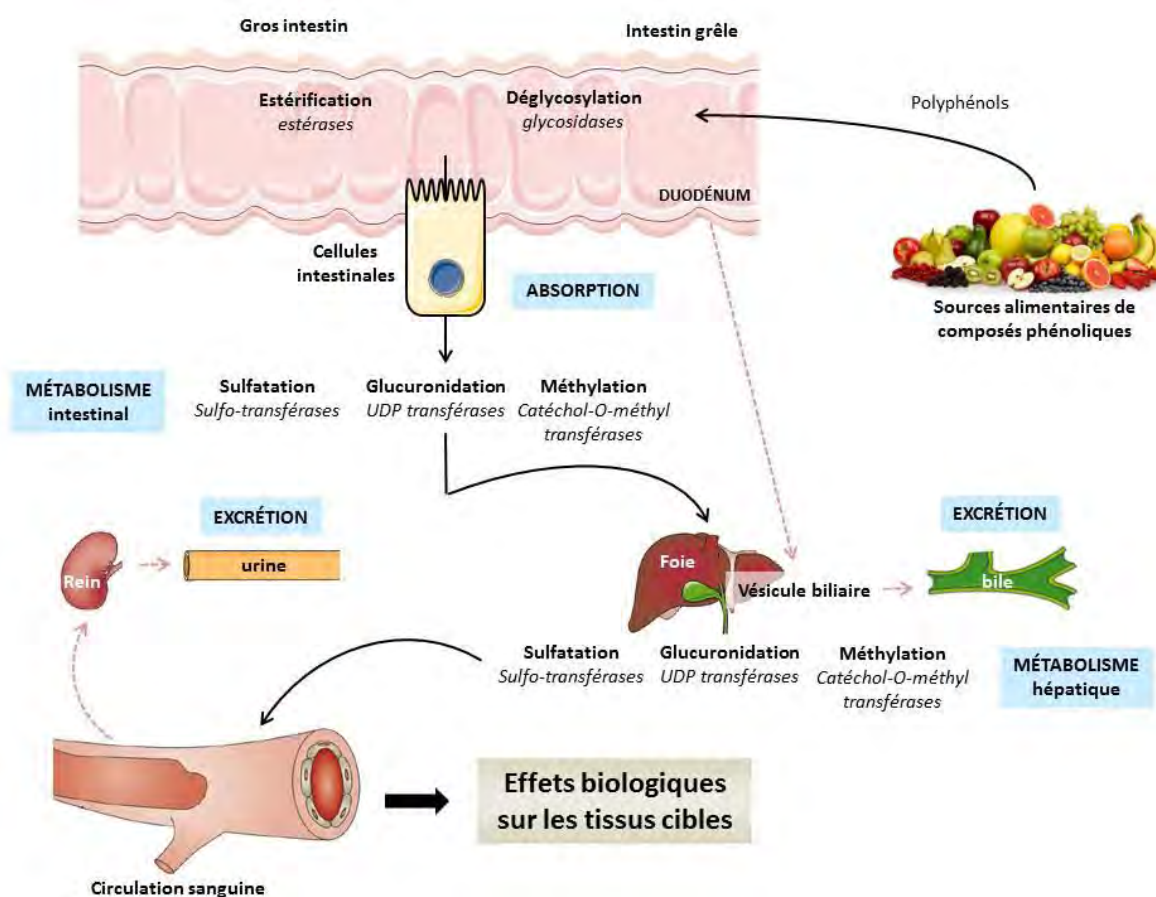


Figure 13 : Les transformations post-ingestion des composés phénoliques.

L'absorption : La structure chimique va grandement influencer sur l'absorption intestinale et la nature des métabolites circulants. Ainsi, le poids moléculaire, la glycosylation et l'estérification sont des paramètres à prendre en compte (Scalbert and Williamson 2000). Les molécules de haut poids moléculaires tels que la théaflavine du thé ($M=568$ g/mol) ou encore les procyanidines qui possèdent un degré de polymérisation variable avec un poids moléculaire (578 g/mol, voire au-delà) seront peu absorbées. La plupart des composés phénoliques, à l'exception de la catéchine et des procyanidines, sont sous forme glycosylée dans les aliments (Scalbert *et al.* 2002). Les polyphénols ne peuvent pas être absorbés sous cette forme par la barrière intestinale, ce qui rend obligatoire leur déglycosylation. Cette étape va se faire sous le contrôle d'enzymes, les glycosidases, qui peuvent être présentes dans l'aliment lui-même, dans la muqueuse intestinale ou encore sécrétées par la microflore colique (Scalbert and Williamson 2000; Manach *et al.* 2004). En plus de la glycosylation, les polyphénols peuvent subir une autre substitution, l'estérification. La plupart des composés phénoliques doivent subir une hydrolyse des motifs esters avant de pouvoir être absorbés. Cette activité d'estérase est assurée par des enzymes se trouvant tout le long de l'intestin.

Le métabolisme : Après avoir subi diverses transformations dans le tube digestif, les composés phénoliques sont absorbés par les cellules intestinales. Dans l'intestin grêle puis le côlon ou alors

directement dans le foie, ils subissent diverses transformations telles que la glucuronidation, la sulfatation ou encore la méthylation (Scalbert *et al.* 2002; Manach *et al.* 2004). Ces conjugaisons se font sous l'influence d'enzymes intestinales ou hépatiques : les UDP transférases, les sulfo-transférases et les catéchol-O-méthyl transférases, respectivement (Scalbert and Williamson 2000; Manach *et al.* 2004). Ces réactions ont pour finalité de faciliter la solubilisation des composés phénoliques dans les fluides biologiques (Scalbert and Williamson 2000). Ainsi, après ingestion, un grand nombre de composés phénoliques circulants sont sous forme conjuguée et il reste difficile de retrouver des formes libres. Bien que les composés phénoliques circulants aient la capacité de rejoindre des tissus de l'organisme, leur capacité à s'accumuler dans des tissus cibles spécifiques nécessite des études approfondies (Manach *et al.* 2004).

Excrétion : Les composés phénoliques ingérés sont rapidement éliminés par voie urinaire ou biliaire (Scalbert *et al.* 2002; Manach *et al.* 2004). La majeure partie des composés phénoliques ingérés (75-99%) n'est pas excrétée dans les urines, suggérant soit qu'ils ne sont pas absorbés par l'intestin, soit qu'ils sont effectivement absorbés mais excrétés dans la bile, soit enfin qu'ils sont métabolisés par la flore intestinale ou les tissus (Scalbert and Williamson 2000). Les composés phénoliques sont sécrétés par la voie biliaire dans le duodénum, où ils sont soumis à l'action d'enzymes bactériennes, en particulier la β -glucuronidase, dans les segments distaux de l'intestin, après quoi ils peuvent être réabsorbés. Ce recyclage entéro-hépatique peut conduire à une présence plus importante de composés phénoliques dans le corps (Manach *et al.* 2004).

2.4.1 Biodisponibilité des procyanidines

Les procyanidines diffèrent de la plupart des autres composés phénoliques végétaux par leur structure polymérique et leur haut poids moléculaire. Cette particularité limite leur absorption au niveau de la barrière intestinale. En effet, les oligomères ayant atteint un degré de polymérisation supérieur ou égal à trois sont peu susceptibles d'être absorbés au niveau l'intestin grêle (Deprez *et al.* 2001). Cependant, peu d'études permettent d'avoir une vision complète quant à l'absorption *in vivo* des oligomères de procyanidines qui reste à ce jour incertaine. Les études portant sur ce sujet conduisent à des conclusions divergentes. En effet, une première étude chez le rat montre qu'après un repas riche en procyanidines B3, les dimères ne sont pas retrouvés dans le sang et les urines alors qu'une seconde étude, toujours chez le rat, identifie des dimères B2 dans le sang et les urines après sa consommation (Baba *et al.* 2002; Donovan *et al.* 2002). Par ailleurs, une récente étude indique qu'une absorption mineure de certains dimères de procyanidines semble possible chez l'homme. En effet, le dimère B2 a été identifié dans le plasma de volontaires après ingestion d'une boisson à base de cacao riche en procyanidines. Toutefois, la concentration plasmatique maximale atteinte 2h après l'ingestion s'est révélée très faible en comparaison de celle de l'épicathéchine ingéré à concentration

équivalente (Holt *et al.* 2002). Bien que les procyanidines soient très mal absorbées malgré leur abondance dans l'alimentation, elles présentent toutefois une importante activité biologique. Ainsi, il est suggéré que la bioactivité de ces dernières serait soit locale dans le tractus gastro-intestinal soit médiée par des acides phénoliques qui sont les produits de leur dégradation microbienne (Halliwell *et al.* 2000).

2.4.2 Biodisponibilité de l'hydroxytyrosol

Peu d'études permettent actuellement d'avoir une visibilité complète de la biodisponibilité des composants de l'olive notamment de l'hydroxytyrosol. Ce dernier est bien absorbé au niveau des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal où il subit une phase de biotransformation. Sa biodisponibilité sous forme native est en revanche très faible. Cela est la conséquence d'un important métabolisme au niveau de l'intestin et du foie conduisant à la formation de conjugués sulfaté ou glucuronides. La quasi-totalité de l'hydroxytyrosol (98%) est présent dans le plasma et l'urine sous ces formes conjuguées (Miro-Casas *et al.* 2003).

L'hydroxytyrosol et la dopamine partagent un métabolite commun, l'acide homovanillique, ce qui représente un inconvénient majeur dans l'évaluation de sa biodisponibilité. Cela implique que l'acide homovanillique retrouvé dans les fluides biologiques (*e.g.* sang, urine) combine des sources endogène et exogène (Caruso *et al.* 2001).

2.5 Rôle des composés phénoliques issus du raisin et de l'olive dans la prévention de maladies liées à l'âge

Le nombre de travaux scientifiques qui s'intéressent aux effets des composés phénoliques a augmenté de façon exponentielle au cours de la dernière décennie. De nombreuses études ont rapporté des effets bénéfiques des composés phénoliques sur la santé. Ainsi, les composés phénoliques se révèlent être un atout dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires, certains types de cancers et le vieillissement en réduisant notamment le stress oxydatif. Actuellement, les procyanidines de raisin et l'hydroxytyrosol d'olive sont le sujet de recherches approfondies dans le but d'établir un lien entre les apports alimentaires et le risque de développer certaines maladies. Les différentes propriétés des procyanidines et de l'hydroxytyrosol seront passées en revue dans les paragraphes suivants.

2.5.1 Activité antioxydante des procyanidines et de l'hydroxytyrosol

L'activité la plus notable des composés phénoliques est sans doute leur capacité antioxydante. Cela se traduit par un très grand nombre de travaux scientifiques publiés, plus de 8000 à ce jour. Le stress oxydatif est le fruit d'une production trop importante de radicaux libres qui sont néfastes pour

l'intégrité cellulaire. Ces derniers interagissent avec leur environnement biologique tel que l'ADN, les lipides (e.g. lipides membranaires) et les protéines. Ainsi, l'établissement d'un stress oxydatif est fortement associé au développement de maladies telles que les cancers ou encore l'athérosclérose. Afin de lutter contre l'oxydation, se mettent en place des systèmes de défense faisant intervenir des enzymes qui comprennent la superoxyde dismutase (SOD) et les glutathion réductase et peroxydase (GPx) permettant de maintenir des taux acceptables de ROS (Peng *et al.* 2014).

Effets rapportés des procyanidines : des études *in vitro* sur différents types cellulaires (principalement des cellules endothéliales et macrophages) ont décrit que les procyanidines contribuent à augmenter l'expression, la production et l'activité de ces enzymes de protection (Packer *et al.* 1999). Par ces mécanismes, les procyanidines pourraient ainsi contribuer à protéger les cellules des dommages, diminuer la production latente de ROS ainsi que la peroxydation des lipides (Rong *et al.* 1994). Des études *in vivo* ont par la suite confirmé l'activité antioxydante des procyanidines (Packer *et al.* 1999).

Effets rapportés des composés phénoliques de l'huile d'olive : l'activité antioxydante des composés phénoliques de l'huile d'olive, en particulier l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, a été étudiée dans de nombreux modèles expérimentaux notamment des modèles cellulaires et animaux (Manna *et al.* 1997). Les effets antioxydants des composés phénoliques de l'huile d'olive ont été notamment évalués dans un modèle de cellules intestinales (Caco-2) et ont permis de souligner la préservation de l'intégrité et la fonction cellulaire (Manna *et al.* 1997). De plus, les composés phénoliques de l'huile d'olive, et en particulier l'hydroxytyrosol, protègent l'oxydation des lipides et de l'ADN (Nousis *et al.* 2005; Rietjens *et al.* 2007).

Ce potentiel antioxydant des composés phénoliques résulte très probablement dans la structure chimique présentant de nombreux cycles phénols et de groupements hydroxyles qui les composent et sont ainsi capables de neutraliser les radicaux libres en formant des radicaux phénoxy stables (Rice-Evans *et al.* 1996).

2.5.2 Effets des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur des lignées cellulaires et certaines formes de cancer

En plus de leurs effets antioxydant et préventif dans le vieillissement, les procyanidines et l'hydroxytyrosol possèdent des propriétés anti-cancéreuse et antimutagène. Leurs modes d'action ont été évalués dans un certain nombre d'études *in vitro*, et plus rarement dans des modèles *in vivo*.

Des études menées sur l'effet des procyanidines ont identifié de nombreuses cibles moléculaires pouvant être utilisées dans la prévention et le traitement de cancers de nombreux organes. Ces

actions sont médiées par des voies de signalisation impliquant l'angiogénèse, l'apoptose, le cycle cellulaire ainsi que la croissance et la prolifération. Le tableau 7 regroupe les dernières avancées sur les propriétés anti-cancérigène et antimutagène des procyanidines sur différentes formes de cancer.

Tableau 7 : Principales études du potentiel des procyanidines sur différentes lignées cancéreuses et formes de cancer.

<i>Modèle</i>	<i>Traitement</i>	<i>Résultats</i>	<i>Références</i>
SEIN			
Lignée MDA MB-231	200µg/mL 24h	↘ croissance par arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1	(Kozikowski <i>et al.</i> 2003)
Souris BALB/c- <i>nu-nu</i>	25, 50 ou 100µL, 42 jours (fraction de vin)	↘ biosynthèse d'estrogène ↘ formation de tumeur	(Eng <i>et al.</i> 2003)
Lignées MDA MB-231, MDA MB-436, MDA MB-268, SKBR-3, MCF-7, 184A1N4, 184B5	25 ou 100µg/mL, 48 à 72h	↘ polarisation de la membrane ↘ phosphorylation Cdc2, FOX, p53	(Ramljak <i>et al.</i> 2005)
MCF-7aro et souris BALB/c <i>nu/nu</i>	20, 40 ou 60µg/mL 1h (<i>in vitro</i>) et 500 ou 750µg 42 jours (<i>in vivo</i>)	↘ expression et inhibiteur d'aromatase ↘ formation de tumeur	(Kijima <i>et al.</i> 2006)
Souris BALB/c	0,2 à 1mg/mL, 28 jours	↘ viabilité ↘ migration	(Sun <i>et al.</i> 2010)
Lignée MCF-7	0,125 à 5mg/mL, 48h	↗ propriété antiproliférative	(Xu and Chang 2012)
Lignée MCF-7	50µM, 48h	↗ cytotoxicité	(Avelar and Gouvea 2012)
Lignées MDA MB-231, MCF-7	25, 50 et 100µg/mL, 24 à 96h	↗ propriété antiproliférative ↗ apoptose ↘ migration et l'invasion	(Dinicola <i>et al.</i> 2013)
Lignée MDA MB-231	58µM, 75µM et 100µM, 48 à 72h	↗ apoptose (Bcl-2, c-Jun, c-Fos) ↘ angiogénèse (VEGF)	(Lewandowska <i>et al.</i> 2013)
Lignée MCF-7	30 et 60µg/mL	↘ viabilité et prolifération ↗ activité antioxydante	(Faria <i>et al.</i> 2006)
Lignées MDA MB-231	1 à 15 µM	↘ activité ADN	(Shilpi <i>et al.</i>

et HaCaT		méthyltransférase	2015)
CÔLON			
Lignée Caco-2	50µg/mL 1 à 10 jours	↘ croissance par arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M	(Carnesecchi <i>et al.</i> 2002)
		↘ biosynthèse de polyamine	
Rats F344 et lignée RCN-9	Eau supplémentée à 0,002 ; 0,01 ou 0,05%, 5 semaines	↗ prévention tumorale	(Nomoto <i>et al.</i> 2004)
		↗ propriété antiproliférative	
		↗ apoptose	
Lignée SW620	50µg/mL, 30 min à 48h	↗ propriété antiproliférative	(Gosse <i>et al.</i> 2006)
		↘ biosynthèse de polyamine	
		↗ apoptose	
Lignée Caco-2	50µg/mL, 72h	↗ apoptose	(Gorlach <i>et al.</i> 2011)
Lignées Caco-2 et HCT-8	25, 50 et 100µg/mL, 24 à 96h	↗ propriété antiproliférative	(Dinicola <i>et al.</i> 2012)
		↗ apoptose	
Lignée Caco-2	17,7 à 70,2 µg/mL, 24, 48 ou 72h (fractions)	↘ viabilité	(Cheah <i>et al.</i> 2014)
Lignées Caco-2 et HT-29	100µg/mL, 24 ou 48h	↗ l'intégrité de la membrane	(Bitzer <i>et al.</i> 2015)
		↘ inflammation (↘IL-8)	
PROSTATE			
Souris <i>nu/nu</i>	100 et 200mg/kg/jour, 7 semaines	↗ propriété antiproliférative	(Singh <i>et al.</i> 2004)
		↗ apoptose	
		↘ angiogénèse	
Lignée DU-145	25 à 100µM, 72h	↗ propriété antiproliférative	(Agarwal <i>et al.</i> 2007)
		↗ apoptose	
Lignée PC-3	300µg/mL, 24h	↗ apoptose	(Shang <i>et al.</i> 2009)
		↘ potentiel de la membrane mitochondriale	
Lignée LNCaP	10 à 50µM, 12h	↗ propriété antiproliférative	(Chou <i>et al.</i> 2010)
		↗ apoptose	
PEAU			
Lignée SK-Mel-28	2, 10 et 50 µg/mL, 72h	↗ propriété antiproliférative	(Tourino <i>et al.</i> 2005)
Lignée B16	1 à 100µg/mL, 3 jours	↘ mélanogénèse	(Shoji <i>et al.</i>

2005)

PANCRÉAS			
Lignées MIA PaCa-2 et BxPC-3	1 à 150µg/mL, 24h à 14 jours	<ul style="list-style-type: none"> ↳ prolifération par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou apoptose ↳ adhésion et invasion 	(Chung <i>et al.</i> 2012)

Concernant l'hydroxytyrosol, celui-ci aurait également un effet protecteur sur le développement de certaines formes de cancers. Des études menées *in vitro* dans des lignées de différentes formes de cancer (sein, côlon, prostate, foie et sang) ont montré une réduction de la multiplication des cellules cancéreuses, de la croissance et de la migration ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. Certaines études tentent d'expliquer ces observations par l'activation de voies de signalisation telles que ERK 1/2, NF-κB ou encore Akt ainsi qu'une production excessive de ROS. Une étude *in vivo* réalisée chez le rat présentant une tumeur du sein a confirmé la réduction de la prolifération et de la croissance des cellules cancéreuses (Tableau 8). D'autres études complémentaires devront cependant être effectuées pour valider ces effets.

Tableau 8 : Principales études du potentiel de l'hydroxytyrosol sur différentes lignées cancéreuses et formes de cancer.

Modèle	Traitement	Résultats	Références
SEIN			
Lignée MCF-7	6,25 à 50µg/mL, 3 à 24h	<ul style="list-style-type: none"> ↳ prolifération par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ↗ apoptose 	(Han <i>et al.</i> 2009)
Lignée MCF-7	1 à 100µM, 48 à 72h	<ul style="list-style-type: none"> ↗ propriété antiproliférative ↳ estradiol (voie ERK 1/2) 	(Sirianni <i>et al.</i> 2010)
Lignée MCF-7	2000 à 3000µg/mL d'extrait de feuille d'olivier riche en HT, 12 à 48h	↳ croissance par arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1	(Bouallagui <i>et al.</i> 2011)
Rats Sprague-Dawley	0,5mg/kg, 5 jours/ semaines pendant 6 semaines	<ul style="list-style-type: none"> ↳ croissance tumorale ↗ propriété antiproliférative 	(Granados-Principal <i>et al.</i> 2011)
Lignées MDA et MCF-7	100µM, 72h	<ul style="list-style-type: none"> ↗ propriété antiproliférative ↗ apoptose 	(Fabiani <i>et al.</i> 2012)

CÔLON			
Lignée HT-115	25µg/mL, 24h	↘ invasion	(Hashim <i>et al.</i> 2008)
Lignée Caco-2	5 à 200µM, 24 à 96h	↘ prolifération par arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M	(Corona <i>et al.</i> 2009)
Lignée HT-29	100, 150 ou 300µM pendant 24 à 48h	↘ croissance par arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M	(Bernini <i>et al.</i> 2011)
Lignées HT-29 et SW620	10 à 100µM, 24 à 72h	↘ prolifération ↗ apoptose	(Notarnicola <i>et al.</i> 2011)
Lignées SW480 et HCT-116	100µM, 72h	↗ propriété antiproliférative ↗ apoptose	(Fabiani <i>et al.</i> 2012)
Lignée DLD1	50, 100 ou 200µM, 24 ou 48h	↗ propriété antiproliférative ↗ apoptose ↗ dysfonctionnement mitochondriale (par production de ROS)	(Sun <i>et al.</i> 2014)
Lignée Caco-2	50µM, 24h	↗ propriété antiproliférative ↗ l'expression du gène suppresseur de tumeur CB ₁	(Di Francesco <i>et al.</i> 2015)
PROSTATE			
Lignées LNCap et PC3	100µM, 72h	↗ propriété antiproliférative ↗ apoptose	(Fabiani <i>et al.</i> 2012)
Lignées PC-3 et DU-145	80µmol/L	↗ dysfonctionnement mitochondriale (par production de ROS) ↗ propriété antiproliférative ↗ apoptose	(Luo <i>et al.</i> 2013)
FOIE			
Lignée HepG2	10 à 40 µM, 2 à 20h	↘ dommages cellulaires ↗ activité antioxydante	(Goya <i>et al.</i> 2007)
Lignées HepG2 et Hep3B	30 à 200µM, 48 à 72h	↗ propriété antiproliférative	(Tutino <i>et al.</i> 2012)
Lignée HCC	100 à 400µM, 48 ou 72h	↘ croissance (voie AKT et NF-κB)	(Zhao <i>et al.</i> 2014)

↘ prolifération par arrêt du
 cycle cellulaire en phase G2/M
 ↗ apoptose

SANG			
Lignée HL60	100µmol/L, 25h à 72h	↘ synthèse ADN ↗ apoptose ↘ prolifération par arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 ↘ CDK6 et ↗ cycline D3 ↗ expression et production de p21 et p27	(Fabiani et al. 2008)
Lignée HL60	100µM, 24 à 96h	↗ apoptose (par production de H ₂ O ₂) ↗ propriété antiproliférative	(Fabiani et al. 2009)

2.5.3 Effets protecteurs des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur le système cardiovasculaire

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire de la paroi artérielle qui résulte d'une agression principalement par les lipoprotéines athérogènes (*low density lipoprotein* (LDL)), couramment appelé « mauvais cholestérol ». D'après des études cliniques récentes, un effet protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires a été attribué au raisin et à l'olive. Cet effet cardioprotecteur est lié aux nombreux polyphénols qui les composent notamment les catéchines, l'épicatéchine, le resvératrol ainsi que les procyanidines pour le raisin (Jimenez *et al.* 2008; Feringa *et al.* 2011; Anderson and Waters 2013) et à l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol de l'olive (Bulotta *et al.* 2014; Hu *et al.* 2014; Vilaplana-Perez *et al.* 2014). Un certain nombre de travaux aussi bien *in vitro*, *ex vivo* qu'*in vivo* ont permis d'acquérir des connaissances relatives au mode d'action de ces composés phénoliques. Parmi les effets observés, notons (i) la prévention de l'oxydation des LDL, (ii) l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, (iii) la stimulation et la sécrétion de NO au niveau endothélial.

Oxydation des LDL : Les radicaux libres sont responsables de l'oxydation des LDL plasmatiques athérogènes (Frankel 2011). Le LDL oxydé est plus néfaste que la forme native de LDL pour la paroi artérielle en raison de sa capacité à promouvoir le processus d'athérosclérose (Witztum and Steinberg 1991). C'est pourquoi, des taux élevés de LDL oxydé circulant prédisent le développement de maladies coronariennes (Meisinger *et al.* 2005). Plusieurs études ont révélé que les procyanidines, à l'instar des autres polyphénols du vin et du raisin, ont la capacité d'inhiber l'oxydation des lipides *in*

in vitro (Frankel *et al.* 1993; Shafiee *et al.* 2003). De même, l'hydroxytyrosol prévient l'oxydation des LDL à la fois dans des modèles *in vitro* et *ex vivo* (Grignaffini *et al.* 1994; Salami *et al.* 1995; Rietjens *et al.* 2007). Chez l'homme, il a été constaté qu'une consommation de polyphénols issus de la vigne ainsi que de l'hydroxytyrosol augmentent la capacité antioxydante de leur plasma dans les heures suivant l'ingestion (Maxwell *et al.* 1994; Whitehead *et al.* 1995; Carbonneau *et al.* 1997; Serafini *et al.* 1998; Bonanome *et al.* 2000; Visioli *et al.* 2001). Ainsi, le plasma a la possibilité de piéger les ROS, responsables de l'oxydation des LDL et ainsi prévenir les maladies cardiovasculaires.

Agrégation plaquettaire : Un autre processus impliqué dans le développement des lésions athéroscléreuses est l'agrégation plaquettaire, qui est l'étape précédant la formation de thrombus (Libby *et al.* 2011). L'effet des composés phénoliques de la vigne et de l'olive sur l'agrégation plaquettaire et les paramètres hémostatiques a été appréhendé dans divers modèles animaux. Ainsi, il a été montré que la supplémentation du régime alimentaire de chiens, singes et rats avec des extraits de raisins bloque l'agrégation des plaquettes (Demrow *et al.* 1995; Osman *et al.* 1998; Xia *et al.* 1998). De plus, des extraits de vin avec ou sans la fraction alcoolique prolonge le temps de saignement, et diminue l'adhésion des plaquettes au collagène fibrillaire (Wollny *et al.* 1999). Tous ces effets protecteurs ont également été observés spécifiquement avec des procyanidines extraites de pépins de raisin (Ruf *et al.* 1995). Des études similaires ont été menées sur le potentiel effet de l'hydroxytyrosol dans la prévention de l'agrégation plaquettaire. Il a aussi été rapporté que l'hydroxytyrosol inhibe complètement l'agrégation plaquettaire dans le plasma riche en plaquettes sanguines. Dans cette même étude, l'hydroxytyrosol s'est également avéré être un inhibiteur de la thrombine (Petroni *et al.* 1995). Récemment, une étude réalisée sur du sang de volontaires sains de pays européens a renforcé l'idée que l'hydroxytyrosol inhibe l'agrégation plaquettaire (Rubio-Senent *et al.* 2014). La voie exacte par laquelle les polyphénols issus de l'olive inhibent l'agrégation plaquettaire reste méconnue, il est supposé qu'ils favoriseraient l'inhibition de la phosphodiesterase spécifique catabolisant l'AMPc (*i.e.* inhibe l'agrégation des plaquettes) sous une forme inactive (Dell'Agli *et al.* 2008). Cependant, l'effet antiagrégant de l'hydroxytyrosol a été jugé équivalent à celui de l'aspirine, suggérant ainsi que les mécanismes impliqués seraient une diminution de la synthèse de thromboxane ainsi qu'une augmentation de la production de NO au niveau vasculaire (Gonzalez-Correa *et al.* 2008).

Stimulation et sécrétion de NO : L'endothélium synthétise et sécrète de nombreuses substances vasoactives qui diffusent vers le muscle lisse et provoquent sa relaxation ou sa contraction. Une des substances vasodilatatrices la plus étudiée est le NO. Ainsi, la diminution de la bioactivité du NO peut provoquer une constriction des artères coronaires. Les procyanidines jouent un rôle important dans la vasorelaxation en permettant de maintenir ou stimuler la production de NO (Andriambeloson *et al.* 1999). Cet effet protecteur a été découvert dans un modèle d'aorte isolée et renforcé dans des

modèles reproduisant l'athérosclérose (Klurfeld and Kritchevsky 1981; Yamakoshi *et al.* 1999). Dans une étude randomisée, 21 volontaires souffrants d'hypercholestérolémie ont été invités à recevoir un petit déjeuner riche en huile d'olive. Après quelques heures, une nette augmentation de la concentration plasmatique de NO corrélée à une amélioration de la fonction endothéliale ont été observées (Ruano *et al.* 2005). Une seconde étude réalisée *in vitro* dans une lignée de cellules endothéliales humaine semble contredire ces observations. En effet, les cellules EA.hy926 exposées à des concentrations croissantes d'hydroxytyrosol (de 10nM à 100µM) n'ont révélé aucun effet sur l'activation du promoteur d'eNOS, sur l'activité de l'enzyme elle-même ainsi que sur la production de NO. Les auteurs concluent que les propriétés antiathérogènes de l'hydroxytyrosol ne sont probablement pas médiées pas la modulation directe de eNOS (Schmitt *et al.* 2007).

2.5.4 Effets des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur d'autres maladies

Diabète de type 2 : le diabète de type 2 est une maladie qui se définit par une augmentation chronique de la glycémie liée à une insulino-résistance et à une diminution de la sécrétion d'insuline. Cette hyperglycémie chronique entraîne à terme des lésions dégénératives d'organes cibles (œil, rein, système cardiovasculaire et nerveux) qui représentent les principales causes de morbidité (Donath and Shoelson 2011). Des études menées dans des modèles mimant la résistance à l'insuline ainsi que la modification de la sécrétion d'insuline à l'aide de différents régimes alimentaires (riche en glucides ou en lipides) montrent que les procyanidines ainsi que l'hydroxytyrosol agissent comme des agents anti-hyperglycémiant (Hamden *et al.* 2008; Gonzalez-Abuin *et al.* 2015).

Maladie d'Alzheimer : la protéine Tau est exprimée par les neurones du système nerveux central. Elle est associée aux microtubules et favorise ainsi leur assemblage et stabilité. Dans de nombreuses maladies appelées tauopathies, dont la principale est la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est hyperphosphorylée. Elle se détache alors des microtubules, une fois libérée elle s'agrège anormalement sous forme de filaments hélicoïdaux. Ces amas empêchent les nutriments de rejoindre les neurones qui finissent par mourir menant à une perte progressive et irréversible de la mémoire. La protéine Tau a la propriété de se propager aux neurones environnants par les synapses jusqu'à envahir progressivement tout le cerveau (Tarasoff-Conway *et al.* 2015). Des études soulignent la capacité de l'hydroxytyrosol ainsi que des procyanidines à inhiber l'agrégation de la protéine Tau (Peterson *et al.* 2009; Pasinetti *et al.* 2010; Daccache *et al.* 2011). D'autres études conduites chez le rat montrent la capacité de ces composés phénoliques à atteindre le cerveau après consommation (Serra *et al.* 2012; Serra *et al.* 2013), suggérant ainsi la capacité d'agir *in situ*.

3. Les nutraceutiques dans la prévention de l'arthrose

De nos jours, il est couramment reconnu qu'une alimentation variée et équilibrée permet la couverture des besoins essentiels en micronutriments nécessaires à un état de santé optimal. En outre, une consommation variée en fruits et légumes permet l'apport de nombreux nutraceutiques pouvant contribuer à prévenir de nombreuses maladies liées à l'âge. Les nutraceutiques avec leur composition chimique riche en composés phénoliques et leur capacité à cibler de multiples voies semblent être de bons candidats dans le cadre de développement de nouvelles stratégies dans la prévention de l'arthrose. De nombreuses études aussi bien physiologiques que fonctionnelles suggèrent que les nutraceutiques permettraient de maintenir la santé osseuse et articulaire (Henrotin *et al.* 2011). Dans ce contexte, les effets des nutraceutiques dans la prévention et le traitement de l'arthrose ainsi que leurs modes d'action ont fait l'objet de l'écriture d'une revue de la littérature : « *Nutraceuticals in joint health : animal models as instrumental tools* » publiée dans le journal *Drug Discovery Today*. Dans cette revue de la littérature des notions de biodisponibilité /pharmacocinétique des nutraceutiques sont abordées ainsi que l'évaluation de l'efficacité des traitements et les voies moléculaires impliquées.

ARTICLE 1

Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools

Elsa Mével, Laurent-Emmanuel Monfoulet, Christophe Merceron, Véronique Coxam, Yohann
Wittrant, Laurent Beck, Jérôme Guicheux

Drug Discovery Today (2014) 19: 1649-1658

Article 1: Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools – Drug Discovery

Today

Résumé:

L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations qui ne possède actuellement aucun traitement curatif. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de nutraceutiques dans le ralentissement et l'évolution de l'arthrose. L'utilisation de modèles animaux est une étape clé et obligatoire dans la démonstration du potentiel protecteur des nutraceutiques sur la santé articulaire. Néanmoins, il existe une grande variété de modèles animaux d'arthrose et le choix d'un système approprié pour évaluer les effets d'un composé spécifique n'est pas une tâche aisée. Dans cette revue, nous discutons des études animales ayant rapporté des effets des nutraceutiques dans la prévention ou le traitement de l'arthrose. En particulier, nous soulignons la grande variété de modèles animaux utilisés à cet effet. Enfin, nous fournissons des recommandations d'utilisation de modèles animaux dans le cadre d'études portant sur l'évaluation de traitements de nutraceutiques.



Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools

Elsa Mével^{1,2,3,7}, Laurent-Emmanuel Monfoulet^{4,5,7}, Christophe Merceron^{1,3},
Véronique Coxam^{4,5}, Yohann Wittrant^{4,5}, Laurent Beck^{1,3,8} and
Jérôme Guicheux^{1,3,6,8}



¹INSERM, UMR 791, Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology team LIOAD, Nantes, France

²Union Grap'Sud, Cruviers-Lascours, France

³Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, France

⁴Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

⁵INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

⁶CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, France

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease with no curative treatments. Many studies have begun to demonstrate the efficacy of nutraceuticals for slowing down OA. Animal models are utilized as a compulsory step in demonstrating the protective potential of these compounds on joint health. Nevertheless, there exist a wide variety of available OA models and selecting a suitable system for evaluating the effects of a specific compound remains difficult. Here, we discuss animal studies that have investigated nutraceutical effects on OA. In particular, we highlight the large spectrum of animal models that are currently accepted for examining the OA-related effects of nutraceuticals, giving recommendations for their use.

Introduction

OA is a chronically evolving degenerative disease that affects a growing number of individuals within our aging population, and is associated with both a higher risk of comorbidity [1] and a strong socio-economic burden [2]. The World Health Organization (WHO) reported in 2003 that approximately 10% of humans over 60-years old displayed significant clinical symptoms of OA, with >50% of humans over the age of 65 showing radiological evidence of OA. Moreover, it is predicted that the prevalence of OA will continue to increase in coming years as the population ages, especially if preventive measures are not taken.

From a physiopathological viewpoint, OA is a heterogeneous disease that induces whole-joint damage [3]. It is characterized by progressive cartilage loss, subchondral bone remodeling, osteophyte formation and a low-grade inflammation that affects all

joint tissues, including the synovium and the infrapatellar fat pad (IFP) (Fig. 1).

OA begins with re-entry of articular chondrocytes into a proliferative program, leading to the formation of clusters with increased anabolic activity and upregulated extracellular matrix synthesis [4]. Eventually, these cells acquire pathological features, becoming hypertrophic repair-like chondrocytes that display augmented catabolic activity. These hypertrophic chondrocytes, along with synovial and immune cells, secrete prostaglandins and interleukin 1beta (IL1 β), which contribute to increased cartilage catabolism. Ultimately, metabolic homeostasis is then broken and the degradation of matrix products overwhelms biosynthesis. This phenomenon primarily results from the synthesis of matrix metalloproteinases (MMPs) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS), which is associated with a decrease in the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) [4]. In addition, overexpressed cytokines lead to an increased production of nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) and leukotrienes, which eventually promote chondrocyte

Corresponding author: Guicheux, J. (jerome.guicheux@inserm.fr)

⁷ Co-first authors.

⁸ These authors contributed equally to this article.

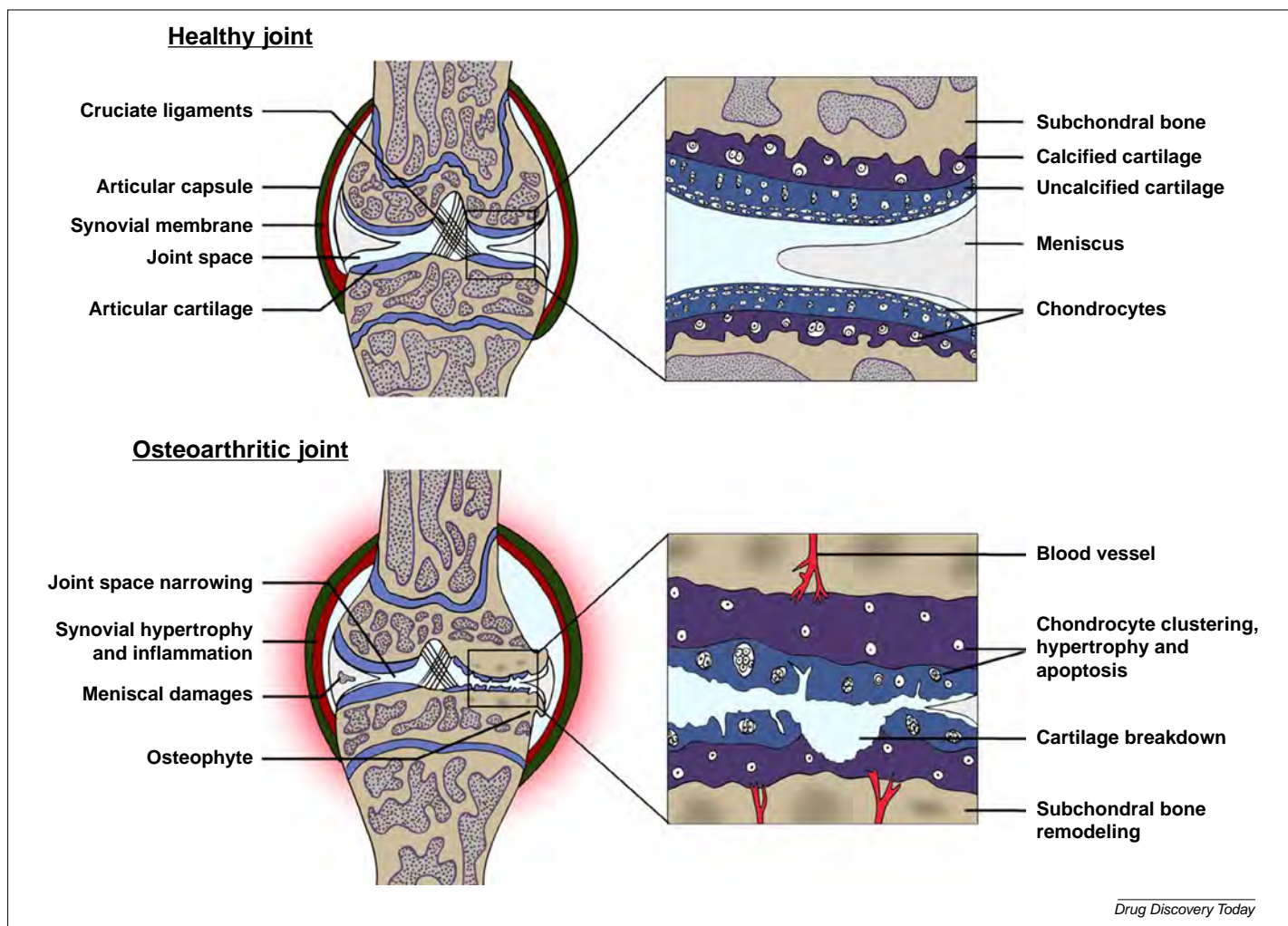


FIGURE 1

Joint tissue affections in knee osteoarthritis (OA). Osteoarthritic joints are characterized by a loss of articular cartilage, synovitis and synovial hypertrophy, as well as sclerosis of subchondral bone, which is accompanied by formation of osteophytes at the joint margins.

apoptosis [5]. In other joint tissues, histological and cellular disorders can also contribute to altered joint homeostasis [3]. Early changes include hyperplasia of the synovial cells ('synovitis'), muscle weakness [6] and fibrillation of the meniscal tissue, as well as thickening of both subchondral bone plate and epiphyseal spongiosa, which are associated with decreased bone mineral content [7].

Collectively, the aforementioned events lead to advanced OA, in which articular cartilage loss is initiated via fibrillation of the superficial zone followed by cartilage damage. Furthermore, cartilage matrix degradation products that are released into the synovial fluid exacerbate inflammation, which results in infiltration of innate immune cells into joint tissues (synovium and IFP) and secretion of inflammatory mediators. As the calcified cartilage zone thickens, the tidemark (i.e. the boundary between calcified and uncalcified articular cartilage) migrates towards the superficial zone [8]. Subsequently, the calcified cartilage becomes invaded by vascular elements, as seen during the endochondral ossification process [9]. Cartilage vascularization enables the recruitment of stem cells, which initiate repair processes (i.e. formation of fibrous cartilage) and lead to an increase in oxygen pressure.

Severe damage of articular cartilage leads to the eburnation of subchondral bone, which produces an imbalance in the mechanical loading of the joint surface. This is likely to contribute to the formation of osteophytes at the joint margins.

Current OA management

To date, there is no curative treatment for OA in humans. Therefore, clinical management focuses only on OA symptoms (e.g. pain and inflammation), using analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). However, these approaches do not prevent the progression of cartilage degradation and can be associated with adverse effects [10]. Nonpharmacological management currently represents the first line of therapy for OA and includes approaches such as weight loss, education, physical therapy or thermal treatment. Nevertheless, when nonpharmacological treatments become insufficient, pharmacological therapies are used. In this regard, analgesics (e.g. acetaminophen), NSAIDs (e.g. cyclooxygenase and/or lipoxygenase inhibitors) and steroidal anti-inflammatories (SAI) are prescribed to reduce OA-related pain and improve mobility [11]. Ultimately, failure of nonsurgical strategies can lead to total knee and hip replacement [12]. For this reason, an active field of

research involves the identification of agents that might prevent, delay or reverse the pathology of OA. Indeed, the emerging role of nutraceuticals could hold promise in this area [13].

The nutraceutical approach to OA treatment

The term 'nutraceutical' combines the words 'nutrition' and 'pharmaceutical' [14]. Thus, in some cases, the term 'dietary supplement' can be used instead. Nutraceuticals is a broad term referring to substances isolated or extracted from food, animals or plants, that have a proven physiological or medical benefit [15].

Currently, there is increasing evidence to suggest that nutraceuticals show protective effects for many pathologies, including cardiovascular disease and cancer [16]. In addition, they have been proposed to promote the maintenance of bone and joint integrity and/or health [17]. So far, several epidemiological studies have investigated the relation between vitamin D serum levels and human joint structure, as well as the link between vitamin D intake and OA [17]. The latter study revealed a good correlation between low vitamin D serum levels and the presence of OA in the knee [18]. Also, glucosamine sulfate and chondroitin sulfate, which are essential components for the synthesis of the proteoglycan molecules of the cartilage extracellular matrix, were reported to be possible nutraceuticals for the prevention or the treatment of OA [19]. However, although it has become well recognized that nutraceuticals are capable of promoting or improving cartilage health, appropriate animal models are necessary for evaluating the effects of these agents. As previously reviewed by other authors, OA can develop naturally in some species (e.g. mouse and guinea pig) or be induced through surgery or chemical treatments [20,21]. Therefore, it is currently necessary to delineate the most relevant and standardized animal models that will allow indepth investigation of the health benefits and modes of action of nutraceuticals in the management of OA.

Animal models used to study nutraceutical-based therapies for OA

Many animal species (e.g. mouse, rat, rabbit, sheep, dog, cat and monkey) have been used to study the effects of nutraceuticals on OA, including surgically or chemically induced as well as, spontaneous models (Table 1). However, none of these models can perfectly mimic OA, because these animals differ physiopathologically from humans in terms of their joint anatomy, genetics, biomechanics and disease parameters (severity, localization and kinetics). Various reviews providing detailed comparisons of these different OA animal models have been published elsewhere [20,21]. Here, we focus on identifying the most appropriate animal models for investigating the potential protective roles of nutraceuticals in OA.

The OA-related effects of various nutraceutical families (e.g. polyphenols [22–26], vitamins [27,28], protein [29,30], alkaloid [31] and others [32–35]) have been mostly studied using surgically induced OA models. This is probably because the surgical protocols have a 100% incidence, display a shorter lesion onset time and reproduce the traumatic etiology of the human disease. Anterior cruciate ligament transection (ACLT) and meniscectomy are the two most commonly used procedures for inducing OA in animals. Surprisingly, although destabilization of the medial meniscus (DMM) and the groove model can be used to surgically induce

an OA phenotype that more closely resembles the human disease than achieved with ACLT, these methods are not currently used in nutraceutical research. This might be because surgery on small mammals is difficult to standardize. For this reason, chemically induced OA models have also been developed. Intra-articular injection of active molecules, such as cytokines [e.g. IL1 β and tumor necrosis factor alpha (TNF α)] [36,37], enzymes (e.g. papain and collagenase) [42,43] or chemicals [e.g. mono-iodoacetate (MIA)] [38–41], has been shown to induce pathologic changes that resemble OA. This is especially true for the MIA, an inhibitor of aerobic glycolysis that elicits chondrocyte death and articular pain, which can be utilized to produce OA that progresses in a similar fashion to that seen in humans [21]. Notably, OA lesions induced through the injection of active molecules are time and dose dependent and can be reversed by the use of low doses. These models have commonly been used to elucidate the anti-inflammatory and catabolic activities of polyphenols [22–26] and alkaloid [31] in OA.

Traumatic and chemical inductions of OA are convenient experimental approaches that enable the study of disease progression from the point of inception. Thus, these methods enable the exploration of nutraceutical effects that range from prevention to elimination of the disease. However, these approaches might not be the most relevant, especially because the onset of OA in humans occurs with aging, which implies that the full spectrum of OA-associated phenotypic features might require time to develop. In this regard, it is known that specific strains of guinea pigs, mice and monkeys can develop spontaneous OA with age. Therefore, these models enable us to study the slow and 'natural' progression of the disease (Table 1). They more closely resemble the human pathology, and might be especially relevant for investigating the preventive potential of specific nutraceuticals on the incidence of OA. Nevertheless, there are few experimental studies that have been conducted using spontaneous models of OA, which might be attributed to the global cost associated with the duration of such methods (i.e. animal facility costs and the amount of food or extract required). Finally and closely linked to clinical OA, animal patients (e.g. dogs and cats) were also used as models to assess the effects of nutraceuticals in studies focusing on improvement of life quality [42–44].

Recommendations for nutraceutical studies

Administration routes of nutraceuticals

Notably, two administration routes have been commonly used for nutraceuticals: local intra-articular injection and oral administration via diet supplementation or feeding (Table 1). The former route ensures control over of the locally delivered dose of nutraceutical compared with the latter. Although intra-articular injection helps to overcome bioavailability issues that might arise because of the oral route, repeated injections increase the risk of infection. Also, when performed in rats [36,41,45–47] and rabbits [23–25,27,33], there is a limited volume that can be injected into the joint cavity (50 ml and 300 ml, respectively). By contrast, oral supplementation of nutraceutical represents a more physiological approach and can be managed autonomously by the patient. In animal studies, oral administration has been performed via gastric gavage [27,28,38–40] or wafers, as well as capsular and other galenic forms [22,29,30,32,35,42,48], which enable more rigorous

TABLE 1

Effects of nutraceuticals on OA in animal studies^a

Animal model of OA	Nutraceutical	Origin	Administration route	Duration treatment	Dose	Main results	Refs
Surgically induced Meniscectomy (mouse)	Procyanidin B3 (polyphenol: flavanol)	Grape seed	Orally	4 weeks (5 days/week), 5 days after surgery	1 mg/10 g body weight	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score ↘ Thickness of pseudocapsule ↘ Chondrocyte cell death ↘ iNOS expression 	[22]
MCL and partial meniscectomy (rat)	Vitamin D3 (vitamin)	Fish oil, liver and milk	Orally	40 days + 4 days before surgery	4IU (100 ng) to 4000 IU (100 µg)/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ OA-induced hypertrophy of femoral condyle ↘ <i>TLR4</i>, <i>MMP3</i>, <i>TNFα</i> and <i>IL1b</i> gene expression during OA induction but not progression 	[27]
Partial medial meniscectomy (rabbit)	Fursultiamine (vitamin)	Seeds and yeast	Orally	8 weeks 3 days after surgery	100 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score ↘ Cartilage fibrillation ↘ Chondrocyte disorganization ↘ MMP1 level enhances chondroprotective effects of GH/CS 	[28]
ACLT (rat)	Quercetin and glutamine (polyphenol: flavanol)	Vegetable (onion)	Intra-articular injection	4 weeks, twice a week	Quercetin 600 µM and glutamine 200 mM in 50 µL PBS	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score ↗ HSP70 and aggrecan expression ↘ Severity of OA 	[45]
(rabbit)	Tetrandrine (alkaloid)	Root of <i>Stephania tetrandrine</i>	Intra-articular injection	1 month after surgery weekly for 6 weeks	20 mg/L in 300 µL	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Mankin score ↘ Cartilage fissures and degradation ↘ MMP (1;3;13) gene expression 	[31]
	Glucosamine (GAG)	Shellfish	Orally	3 weeks after surgery for 8 weeks	100 mg/day	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score ↗ PG content 	[32]
	CMC (carbohydrate)	Shellfish	Intra-articular injection	Injection at 1, 3 and 5 weeks after surgery	0.3 mL 2% CMC	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Cartilage degradation ↘ <i>MMP1</i> gene expression 	[33]
	Chlorogenic acid (polyphenol: phenolic acid)	Sunflower seeds, flour, artichoke, coffee and bean	Intra-articular injection	Weekly for 6 weeks after surgery	20 µM in 300 µL	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score ↘ Chondrocyte disorganization ↘ Superficial cartilage lesions ↘ MMP (1;3;13) ↗ TIMPs 	[23]
ACLT + medial meniscus meniscectomy (rabbit)	Resveratrol (polyphenol: stilbene)	Red wine, grape skin, peanut and blackberry	Intra-articular injection	5 weeks after surgery, daily for 2 weeks,	10 µmol/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ OA score ↘ Synovial inflammation 	[24]
	Resveratrol (polyphenol: stilbene)	Red wine, grape skin, peanut and blackberry	Intra-articular injection	5 weeks after surgery, daily for 2 weeks	10–20 or 50 µmol/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score ↘ NO release in synovial fluid ↗ Cartilage surface ↘ TUNEL staining 	[25]
ACLT + partial meniscectomy (rabbit)	Glucosamine, CS and manganese ascorbate (GAG: mineral)	Shellfish (glucosamine), vegetables and fruit (manganese)	Orally	14 weeks	Diet supplemented with 2% Cosamin®DS (500 mg/g glucosamine, 400 mg/g CS, 76 mg/g manganese ascorbate)	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total modified Mankin score ↗ GAG synthesis ↘ Catabolic enzymes 	[34]

ACLT (Dog)	ASU (protein)	Avocado and soybean	Orally	8 weeks	10 mg/kg/day	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total OA Cook score [29] ↘ Superficial cartilage fibrillation ↗ Subchondral bone parameters ↘ iNOS and MMP13 immunostaining
	BCD extract (multifamily)	<i>Brachytemma calycinum</i>	Orally	8 weeks	200 mg/kg/day	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total OA severity score [35] ↘ Depth of cartilage lesions ↘ iNOS and MMP13 expression ↗ Mechanical properties
Meniscectomy (ovine)	ASU (protein)	Avocado and soybean	Orally	1 month after surgery for 3–6 months	900 mg/day (Piasclidine300®)	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Mankin score [30] ↗ Uncalcified cartilage thickness ↘ Subchondral bone sclerosis ↗ PG content
Ovariectomy (monkey)	Soy protein extract enriched in Genistein (polyphenol: flavonoid)	Soy	Orally	36 months	129 mg/day	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Articular cartilage thickness [26] ↘ Calcified cartilage thickness ↘ OA severity score ↗ Type 2 collagen expression?
Chemically induced						
MIA injection (mouse)	Pomegranate juice	Pomegranate	Orally	Daily for 2 weeks	4, 10 or 20 ml/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ OA severity score [38] ↘ Cartilage damage ↘ Inflammation of synovial membrane
(rat)	GSPE (polyphenol: anthocyanin)	Grape seed	Orally	4 weeks, 3 times a week after OA induction	100 or 300 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Pain [39] ↘ Osteoclast number in subchondral bone and bone alterations (sclerosis and osteophyte) ↘ Total Mankin score ↗ Cartilage organization ↘ IL1β and MMP13 immunostaining ↘ Chondrocyte loss and PG content
	Silymarin (polyphenol: flavonolignan)	<i>Carduus marianus</i> (milk thistle)	Orally	14 days after OA induction	50 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Fibrillated cartilage surface [40] ↘ Inflammation (NO, IL1β) ↘ Oxidative stress (malondialdehyde and lipid peroxidation)
IL1β injection (rat)	Capsaicin (alkaloid)	Chili pepper	Single intra-articular injection	14 days before OA induction	0.5% in 100 μ L	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Subchondral bone alteration [41] ↘ Pain
	Morin (polyphenol: flavonoid)	Herbs	Intra-articular injection	3 h before IL1 β injection	50 μ M in 50 μ L PBS	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score [46] ↘ iNOS and COX2 expression
	Berberine (alkaloid)	Medicinal herbs	Intra-articular injection	3 h before IL1 β injection	10 μ M or 100 μ M in 50 μ L PBS	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Total Mankin score [36] ↘ MMPs (-1, -3 and -13) expression ↗ TIMP expression ↘ NO and GAG release

TABLE 1 (Continued)

Animal model of OA	Nutraceutical	Origin	Administration route	Duration treatment	Dose	Main results	Refs
Papain injection (rat)	Sesamine (polyphenol: lignan)	Sesame	Intra-articular injection	Every 5 days for 25 days after last papain injection	1 or 10 μ M	↗Cartilage thickness ↘Chondrocyte disorganization ↗PG and collagen content ↗Safranin O staining ↗GAG content	[47]
Chymopapain-induced OA (rabbit)	Chondroitin sulfate (GAG)	Shark skeleton	Orally	Daily for 84 days	80 mg/kg (Condrosulf®)	↗GAG content	[48]
Spontaneous STR-Ort strain (mouse)	MSM (organic sulfur compound)	Grains, vegetables, fruit and cow's milk	Orally	13 weeks	0.06–6 g/kg/day	↘Total Mankin score ↘Articular cartilage damage ↘Meniscus injury	[49]
STR-1N strain (mouse)	Vitamins (E, C, A, B2 and B6) and selenium (vitamins and micronutrients)	Fruit, vegetables and liver	Orally	12 months	Enriched in vitamins and 2 mg/kg selenium	↘OA incidence ↘Cartilage erosion and tide mark exposure ↗Antioxidative enzyme expression	[50]
DH strain (guinea pig)	<i>n</i> -3 PUFAs (Lipid)	Oils (olive) and fish	Orally	20 weeks	5% of <i>n</i> -6: <i>n</i> -3 (1.5:1)	↘Total OARSI score ↘MMP2 and MMP9 secretion ↗GAG and collagen content ↗Subchondral bone parameters	[51]
Spontaneous OA (dog)	Chondroitin sulfate (GAG)	Quality elk velvet antler	Orally	Daily for 60 days	1 capsule of 280 mg per 20 kg body weight	↗Activity and reactivity	[42]
	<i>n</i> -3 PUFAs (lipid)	Flaxseed and fish	Orally	13 weeks	Diet supplemented with 1.08% EPA and DHA	↗Functional mobility	[43]
Clinical OA (cat)	<i>n</i> -3 PUFAs (lipid)	Oil (olive) and fish	Orally	10 weeks	ETA 15 mg/ml, EPA 500 mg/ml DHA 100 mg/ml, 1 ml/kg	↗Mobility and activity	[44]

^a Abbreviations: ASU, avocado/soybean unsaponifiable; BCD, *Brachytemma calycinum* D don; CMC, carboxymethylated chitin; COX, cyclooxygenase; CS, chondroitin sulfate; DH, Dunkin-Hartley; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; ETA, eicosatetraenoic acid; GAG, glycosaminoglycan; GH, glucosamine hydrochloride; GSPE, grape seed procyanidin extract; HSP, heat-shock proteins; iNOS, inducible NO synthase; IU, international unit; MCL, medial cruciate ligament; MIA, mono-iodoacetate; MSM, methylsulfonylmethane; *n*-3, omega-3; *n*-6, omega 6; PG, proteoglycan; TGF, tumor growth factor; TUNEL, dUTP nick end labeling.

control of the administered dose compared with diet supplementation [26,34,43,44,49–51]. Nevertheless, oral administration must take into account both the manufacturing process and compound stability (e.g. susceptibility to oxidation and thermo-lability) to preserve its bioactivity.

Pharmacokinetic and bioavailability

Nutraceuticals have to be absorbed from the intestine and can be subsequently modified (e.g. deglycosylation, glucuronate modification and/or conjugation with sulfates), which can result in metabolites that are chemically distinct from the native molecules found in food [52]. Given that the fate of many nutraceuticals is unknown, several studies have investigated the effects of intra-articular injections of nutraceuticals before and/or after the induction of experimental OA (Table 1). Using this procedure, the authors examined the local and direct effects of nutraceuticals on joint cells. Although promising, results obtained using local intra-articular administration should be taken with caution because of the aforementioned reasons. It is important to keep in mind that nutraceuticals are meant to be part of the daily diet becoming digested and absorbed. The resulting metabolites that reach the peripheral circulation and the tissues are different from those nutrients present in the supplemented diet. However, this does not mean that the metabolite is inactive. For example, the metabolic fate of dietary polyphenols is well known [53] and might determine the nutrient bioactivity. This was well illustrated by Yang *et al.*, who reported that hesperitin, a metabolite of hesperidin (a polyphenol found in citrus fruits), contained in serum of hesperidin-fed rats, showed potent anti-inflammatory activity, whereas the native hesperidin molecule did not [54]. Considering the impact of metabolic modifications on nutraceutical bioactivity, the relevance of findings obtained in studies using intra-articular administration of nutraceuticals must be carefully interpreted or confirmed using diet-supplemented approaches. Surprisingly, none of the studies cited here have investigated the bioavailability of the tested compounds upon both administration routes.

In addition to the pharmacokinetic aspects, another key parameter involves the bioavailability of nutraceuticals and their metabolites in serum. Manach *et al.* [53] and Kroon *et al.* [55] reported that the maximum human plasma concentration of polyphenols or their metabolites was usually reached between 1 and 6 h following a polyphenol-rich meal ranging from 0.1 to 10 Mmol/L. Notably, within this concentration range, these compounds were shown to exhibit chondroprotective activities *in vitro* on primary articular chondrocytes [56]. Apart from these latter studies, none of the other reports presented in this review measured the plasma concentration of nutraceuticals (or of their metabolites) following diet supplementation.

Experimental design

Four distinct protocols were reported that allowed assessment of the preventive or curative potential of nutraceuticals (Fig. 2). The first model was designed to assess the preventive nature of compounds (Fig. 2a). For this, the compounds, capsaicin [41], morin and berberine [36,46], were administered to the animal before disease development. Nutraceuticals given as a preventive treatment might also be held after natural development of OA [49–51] or after surgically induced OA [27] (Fig. 2b). In the third protocol design, OA was induced in animals via surgery or chemical induction, and

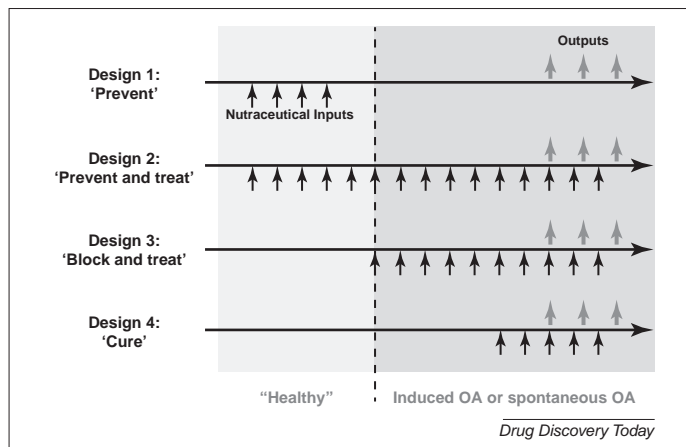


FIGURE 2

Experimental designs reported in the literature to evaluate the effectiveness of nutraceuticals on osteoarthritis (OA). To evaluate the potential to prevent or alleviate the development of symptomatic disease, nutraceuticals could be supplied before the induction of pathogenesis (Design 1). This supplementation could then be maintained to slow down the progression of OA (Design 2). Nutraceuticals can also be tested to reduce or cure the pathology (Designs 3 and 4, respectively).

immediately treated with nutraceuticals [23,26,29,35,38,39,45] (Fig. 2c), thereby examining whether nutraceuticals could counteract the development of OA and its progression. Finally, the last design involved a delay in the start of treatment from 3 days to 1 month [22,24,25,28,30–32,40,47] (Fig. 2d).

Nevertheless, even though the aforementioned experimental designs collectively illustrated that nutraceuticals represent anti-OA candidates, none demonstrated a total inhibition of induced-OA and only two of these protocols could be clinically translated to humans (Fig. 2b,d).

Evaluation of nutraceutical therapy

OA grading is generally determined through histology and appears to be the gold standard for assessing nutraceutical efficiency. Mankin and OARSI scores were the most used in the studies analyzed here. The Mankin score is historically the oldest (1971) and was developed in a study that examined femoral heads removed during arthroplastic surgery in patients with advanced OA. Therefore, this method is not effective for evaluating early OA [57]. By contrast, the OARSI score (created in 1998) takes subchondral bone changes into consideration. In addition, it assesses cellular and histological cartilage damage. Considering this information, it is surprising that the most popular scoring system used in the studies referenced in Table 1 was the Mankin method. Indeed, the OARSI standardized scoring system for cartilage and periarticular tissue health allows a priori comparison of the effects of nutraceuticals, despite the lack of homogeneity in treatments, models and standard controls between independent studies. To understand thoroughly the mechanisms underlying the actions of nutraceuticals, gene expression analyses are commonly used. Indeed, examining the expression of genes related to inflammation [27] and cartilage anabolism [26] or catabolism [31,36] in cartilage tissue [27,31] revealed that nutraceuticals modulated these expression patterns to improve cartilage health.

Mechanistic action of nutraceuticals on OA

Anti-OA properties of nutraceutical families

Polyphenols, a nutraceutical family found in fruits, vegetables and plants, are well recognized for their anti-inflammatory and anti-oxidative activities. For this reason, they have been tested in different animal models of OA. Interestingly, polyphenols induce a reduction of oxidative stress markers [25,37,40] and inflammation [24,40] that is associated with a potent reduction in pain and structural damage [38,39]. Specifically, certain polyphenols, such as procyanidin B, chlorogenic acid, resveratrol or sesamin, can reduce chondrocyte damages (cell death and disorganization). Thus, these treatments result in an improved histological OA scores. In addition, other nutraceuticals have displayed similar results and can be used to manage OA (e.g. alkaloids [31,36,41], carbohydrate [33], organic sulfur compound [49] or certain plant extracts [35]).

Some authors fed animals with protein- [29,30] or glucosamine-supplemented [42,48] diets to counteract the loss of cartilage observed in OA. Indeed, proteins can ensure an adequate supply of substrate to stimulate cartilage anabolism. As expected, the

authors observed an increase in proteoglycan content in the protein- or glucosamine-supplemented groups, resulting in the thickening of cartilage and improved histological scores compared to controls. As a consequence, improved mobility was also reported.

Poly-unsaturated fatty acids (PUFAs), which are lipids well known for their anti-inflammatory properties, have also been used to treat OA symptoms and progression [58]. In this regard, Knott *et al.* investigated the benefit of omega-3 (*n*-3) enriched diets in Dunkin-Hartley guinea pigs [51] and found that *n*-3 reduced disease parameters in OA-prone animals compared with an OA-resistant strain. Also, using clinical animals such as cats and dogs with naturally occurring OA, it was reported that *n*-3 supplemented diets could improve mobility and activity [43,44].

An important goal is to prevent the development of OA altogether. Notably, one report has indicated that nutraceuticals, especially vitamins and minerals, can reduce OA incidence in genetically modified mice (STR/1N) [50]. This OA prevention probably results from the anti-inflammatory properties of these vitamins [27].

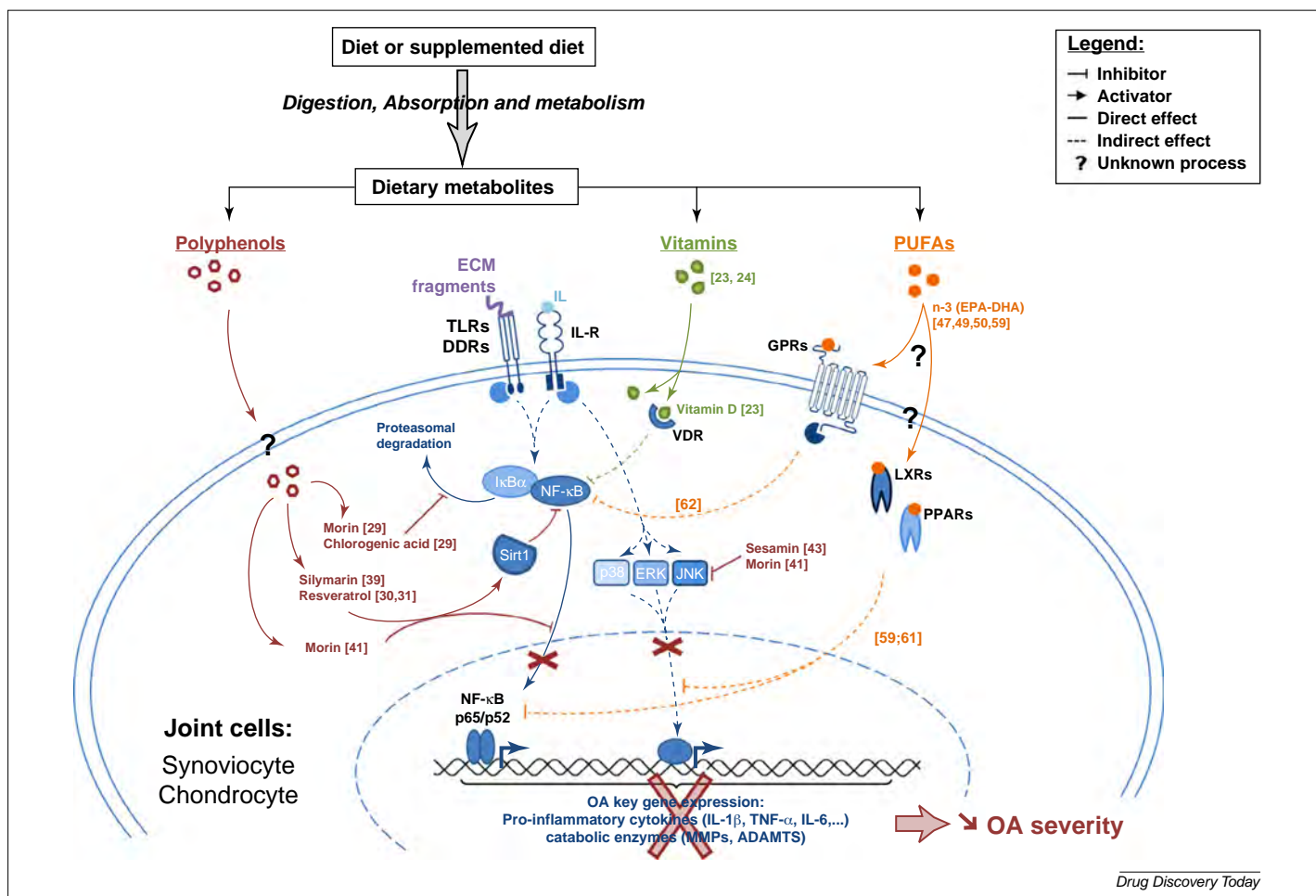


FIGURE 3

Molecular mechanisms of action of nutraceuticals on joint cells. Nutraceuticals alleviate inflammation and cartilage degradation by modulating nuclear factor (NF)-κB and mitogen-activated protein kinases [extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38 kinase and c-Jun N-terminal kinase (JNK)]. These critical pathways were activated by inflammatory stimuli [interleukin (IL)-1β] or extracellular matrix fragments, which are recognized as damage-associated molecular patterns (DAMPs), leading to the expression of matrix metalloproteinases (MMPs), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) and inflammatory cytokines that participate in cartilage degradation. The supplementation of nutraceuticals can block many steps of these signaling pathways to decrease osteoarthritis (OA) severity. For additional definitions, please see the main text.

Molecular mechanisms of action

The dietary supplements and intra-articular injections outlined in this review were shown to be beneficial for OA treatment, suggesting that nutraceuticals act on joint cells (synoviocytes and chondrocytes) to modulate the expression of key genes regulating OA onset. In this regard, a tempting scheme of the underlying cellular and molecular mechanisms that mediate the action of nutraceuticals is outlined in Fig. 3. Many reported nutraceutical pathways are known to inhibit nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation. NF- κ B, is a key transcription factor that drives the expression of OA inducer genes in response to the activation of toll-like receptors (TLRs) and interleukin receptor (IL-R) by extracellular matrix fragments and IL-1 β , respectively [59]. In addition to NF- κ B activation, the expression of pro-inflammatory cytokines and catabolic enzymes can be activated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway through the extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2, p38 kinase and c-Jun N-terminal kinase (JNK). Indeed, some polyphenols (e.g. sesamin and morin) have been found to inhibit these pathways [46,47]. Among others possible modes of action, fatty acids might act directly on G protein-coupled receptors (GPRs) or other lipid-activated nuclear receptor families, such as liver X receptors (LXRs) and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) [60]. The activation of GPRs by natural or synthetic agonists is known to inhibit the NF- κ B pathway [61]. In addition, signaling through PPAR γ has been shown to interfere with NF- κ B and to regulate gene expression directly to decrease inflammatory markers. Similarities have been reported from *in vitro* studies examining chondroitin sulfate, which inhibits NF- κ B nuclear translocation and phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2, and JNK [62]. PUFAs, similar to many other nutrients, can modulate mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling, leading to a protective activation of autophagy in chondrocytes [58]. In addition, a nutrient-sensitive pathway dependent on sirtuin 1 (SIRT1), a class III histone deacetylase that is a member of the sirtuin family, was recently described. Notably,

downregulation of SIRT1 was reported to heighten OA progression in induced models and during aging [63]. For example, SIRT1 activation in the presence of resveratrol interferes with NF- κ B signaling, resulting in anti-inflammatory effects during OA [64]. Unexpectedly, none of the studies cited in this review assessed whether the nutraceuticals can activate SIRT1 *in vivo*. Overall, it appears that nutraceuticals can target different molecular pathways involved in OA progression, suggesting that they exhibit cumulative effects or act in synergy to counteract OA. Thus, these findings suggest that it would be interesting to associate several classes of nutraceutical to obtain a more efficient therapeutic strategy.

Concluding remarks and future directions

Here, we have examined several studies that highlight the effectiveness of nutraceuticals in OA management. We have also discussed various animal models of OA, which represent relevant preclinical tools for studying the effects of dietary supplements on OA. However, in regard to future clinical therapy, spontaneous OA animal models appear to recapitulate most closely the human pathology, enabling us to follow the evolution of the disease. Moreover, we have highlighted the wide range of biological effects that can be elicited by nutraceuticals, including anti-inflammatory actions, pain reduction and gain of mobility. Furthermore, a synergic therapy involving the use of different nutraceutical families might prove to be a promising approach for treating OA, because it could combine the various biological effects of these agents. Finally, encouraging results have been obtained in animals using double-blind experiments, perhaps representing a final step before initiating clinical trials to examine the use of nutraceutical therapy in patients with OA.

Acknowledgments

The authors gratefully thank the Arthritis Foundation 'Courtin' and the National Network 'ROAD', which supported this work.

References

- Nuesch, E. *et al.* (2011) All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *Br. Med. J.* 342, d1165
- Leardini, G. *et al.* (2004) Direct and indirect costs of osteoarthritis of the knee. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22, 699–706
- Loeser, R.F. *et al.* (2012) Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64, 1697–1707
- Goldring, M.B. and Marcu, K.B. (2009) Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 11, 224
- Amin, A.R. *et al.* (2000) COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2, 447–453
- Hart, H.F. *et al.* (2012) Quadriceps volumes are reduced in people with patellofemoral joint osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 863–868
- Chappard, C. *et al.* (2006) Subchondral bone micro-architectural alterations in osteoarthritis: a synchrotron micro-computed tomography study. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 215–223
- Pesesse, L. *et al.* (2011) Osteochondral plate angiogenesis: a new treatment target in osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 78, 144–149
- Mapp, P.I. *et al.* (2008) Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 61–69
- Nakamura, H. (2011) Application of glucosamine on human disease: osteoarthritis. *Carbohydr. Polym.* 84, 835–839
- Clouet, J. *et al.* (2009) From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov. Today* 14, 913–925
- Felson, D.T. *et al.* (2000) Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches. *Ann. Intern. Med.* 33, 726–737
- Akhtar, N. and Haqqi, T.M. (2012) Current nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a review. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 4, 181–207
- Zeisel, S.H. (1999) Regulation of 'nutraceuticals'. *Science* 285, 1853–1855
- Kalra, E.K. (2003) Nutraceutical: definition and introduction. *AAPS PharmSci.* 5, E25
- Das, L. *et al.* (2012) Role of nutraceuticals in human health. *J. Food Sci. Technol.* 49, 173–183
- Henrotin, Y. *et al.* (2011) Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? A narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1–21
- McAlindon, T.E. *et al.* (1996) Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* 125, 353–359
- Vangsness, C.T., Jr *et al.* (2009) A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis. *Arthroscopy* 25, 86–94
- Gregory, M.H. *et al.* (2012) A review of translational animal models for knee osteoarthritis. *Arthritis* 2012, Article ID 764621, 14 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/764621>
- Little, C.B. and Smith, M.M. (2008) Animal models of osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.* 4 (3)
- Aini, H. *et al.* (2012) Procyandin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. *PLoS One* 7, e37728
- Chen, W.P. *et al.* (2011) Anti-arthritis effects of chlorogenic acid in interleukin-1beta-induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. *Int. Immunopharmacol.* 11, 23–28

- 24 Elmali, N. *et al.* (2005) Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflamm. Res.* 54, 158–162
- 25 Wang, J. *et al.* (2012) Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. *Rheumatol. Int.* 32, 1541–1548
- 26 Ham, K.D. *et al.* (2004) Effects of long-term estrogen replacement therapy on articular cartilage IGFBP-2, IGFBP-3, collagen and proteoglycan levels in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 160–168
- 27 Castillo, E.C. *et al.* (2012) Effects of Vitamin D supplementation during the induction and progression of osteoarthritis in a rat model. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 156563
- 28 Kobayashi, T. *et al.* (2005) Fursultiamine, a vitamin B1 derivative, enhances chondroprotective effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in rabbit experimental osteoarthritis. *Inflamm. Res.* 54, 249–255
- 29 Boileau, C. *et al.* (2009) 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.* 11, R41
- 30 Cake, M.A. *et al.* (2000) Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU). *Osteoarthritis Cartilage* 8, 404–411
- 31 Zhou, X. *et al.* (2013) Tetrandrine inhibits the Wnt/ β -catenin signalling pathway and alleviates osteoarthritis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 809579
- 32 Tiraloche, G. *et al.* (2005) Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 1118–1128
- 33 Hongbin, W. *et al.* (2004) Carboxymethylated chitin reduces MMP-1 expression in rabbit ACLT osteoarthritic cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 369–372
- 34 Lippiello, L. *et al.* (2000) *In vivo* chondroprotection and metabolic synergy of glucosamine and chondroitin sulfate. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 381, 229–240
- 35 Boileau, C. *et al.* (2009) Oral treatment with a *Brachytemma calycinum* D don plant extract reduces disease symptoms and the development of cartilage lesions in experimental dog osteoarthritis: inhibition of protease-activated receptor 2. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1179–1184
- 36 Hu, P.F. *et al.* (2011) Protective effects of berberine in an experimental rat osteoarthritis model. *Phytother. Res.* 25, 878–885
- 37 Chen, W.P. *et al.* (2012) Morin inhibits interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 12, 447–452
- 38 Hadipour-Jahromy, M. and Mozaffari-Kermani, R. (2010) Chondroprotective effects of pomegranate juice on monoiodoacetate-induced osteoarthritis of the knee joint of mice. *Phytother. Res.* 24, 182–185
- 39 Woo, Y.J. *et al.* (2011) Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Exp. Mol. Med.* 43, 561–570
- 40 Ashkavand, Z. *et al.* (2012) Silymarin potentiates the anti-inflammatory effects of Celecoxib on chemically induced osteoarthritis in rats. *Phytomedicine* 19, 1200–1205
- 41 Kalf, K.M. *et al.* (2010) Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *Eur. J. Pharmacol.* 641, 108–113
- 42 Moreau, M. *et al.* (2004) Clinical evaluation of a powder of quality elk velvet antler for the treatment of osteoarthritis in dogs. *Can. Vet. J.* 45, 133–139
- 43 Moreau, M. *et al.* (2004) Effects of feeding a high omega-3 fatty acids diet in dogs with naturally occurring osteoarthritis. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 830–837
- 44 Corbee, R.J. *et al.* (2012) The effect of dietary long-chain omega-3 fatty acid supplementation on owner's perception of behaviour and locomotion in cats with naturally occurring osteoarthritis. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 846–853
- 45 Fujita, S. *et al.* (2011) Combined microwave irradiation and intraarticular glutamine administration-induced HSP70 expression therapy prevents cartilage degradation in a rat osteoarthritis model. *J. Orthop. Res.* 30, 401–407
- 46 Chen, W.P. *et al.* (2012) Morin exerts antiosteoarthritic properties: an *in vitro* and *in vivo* study. *Exp. Biol. Med.* 237, 380–386
- 47 Phitak, T. *et al.* (2012) Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry* 80, 77–88
- 48 Uebelhart, D. *et al.* (1998) Protective effect of exogenous chondroitin 4,6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage* 6 (Suppl. A), 6–13
- 49 Ezaki, J. *et al.* (2013) Assessment of safety and efficacy of methylsulfonylmethane on bone and knee joints in osteoarthritis animal model. *J. Bone Miner. Metab.* 31, 16–25
- 50 Kurz, B. *et al.* (2002) Dietary vitamins and selenium diminish the development of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/1N mice. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 119–126
- 51 Knott, L. *et al.* (2011) Regulation of osteoarthritis by omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids in a naturally occurring model of disease. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1150–1157
- 52 Rein, M.J. *et al.* (2013) Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 588–602
- 53 Manach, C. *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747
- 54 Yang, H.L. *et al.* (2011) Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an *ex vivo* approach. *J. Agric. Food Chem.* 60, 522–532
- 55 Kroon, P.A. *et al.* (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 15–21
- 56 Shen, C.L. *et al.* (2012) Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1367–1377
- 57 Pritzker, K.P. *et al.* (2006) Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 13–29
- 58 Villalvilla, A. *et al.* (2013) Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 20793–20808
- 59 Scanzello, C.R. *et al.* (2008) Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin. Rheumatol.* 20, 565–572
- 60 Calder, P.C. (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 645–662
- 61 Wauquier, F. *et al.* (2013) The free fatty acid receptor G protein-coupled receptor 40 (GPR40) protects from bone loss through inhibition of osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.* 288, 6542–6551
- 62 Jomphe, C. *et al.* (2008) Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1 β -stimulated chondrocytes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 59–65
- 63 Matsuzaki, T. *et al.* (2013) Disruption of Sirt1 in chondrocytes causes accelerated progression of osteoarthritis under mechanical stress and during ageing in mice. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1397–1404
- 64 Hubbard, B.P. *et al.* (2013) Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 339, 1216–1219

II- OBJECTIF DE LA THÈSE :

Intérêt de l'utilisation des procyanidines et de l'hydroxytyrosol dans la prévention de l'arthrose

Bien que l'arthrose soit une des maladies les plus invalidantes de notre époque, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Les stratégies thérapeutiques actuelles se tournent de plus en plus vers une prévention nutritionnelle de l'arthrose. Dans le cadre de cette stratégie préventive, les composés phénoliques sont des candidats de choix. Parmi les composés phénoliques, l'hydroxytyrosol et les procyanidines présentent un effet protecteur dans de nombreuses maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète ou encore les maladies neurodégénératives. Ainsi, il est probable que les procyanidines et l'hydroxytyrosol puissent fournir une alternative avantageuse dans la prévention ou le traitement à long terme des maladies ostéo-articulaires et en particulier l'arthrose. En effet, les études existantes suggèrent que les procyanidines auraient un effet protecteur grâce à leur potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. Cela a notamment été souligné au cours d'une étude conduite dans un modèle d'arthrose induite chez la souris (Aini *et al.* 2012) ainsi que dans quelques études cliniques (Belcaro *et al.* 2008; Belcaro *et al.* 2008; Cisar *et al.* 2008) (Tableau 9). En revanche, ces études n'abordent pas les points clés dans l'élaboration d'un traitement anti-arthrosique à savoir les effets des procyanidines au niveau moléculaire, leur mode d'action ou encore leur biodisponibilité. Concernant l'effet de l'hydroxytyrosol, seule une étude menée dans un modèle de chondrocytes isolés *in vitro* (Facchini *et al.* 2014) et une étude clinique (Takeda *et al.* 2013) offrent quelques bribes de réponses. En effet, ces études émettent l'hypothèse que l'hydroxytyrosol diminue les marqueurs de l'arthrose dans un modèle de chondrocytes isolés traités par de l'H₂O₂ ou dans un modèle de micromasses traitées par du GRO α (*growth-related oncogen alpha*). Une étude clinique en double aveugle note que l'hydroxytyrosol pourrait servir d'alternative aux antidouleurs pharmaceutiques classiques (Tableau 9) dans la prise en charge symptomatique de l'arthrose. Cependant ces données ne fournissent pas de preuve suffisantes et n'apportent aucune indication quant aux voies de signalisation empruntées et à la biodisponibilité de l'hydroxytyrosol.

Tableau 9 : Principales études scientifiques du potentiel des procyanidines et de l'hydroxytyrosol sur la prévention ou le traitement de l'arthrose. WOMAC (*Western Ontario and Mc Master University*) : index de sévérité de l'arthrose des membres inférieurs, CRP (*C-reactive protein*) : niveaux plasmatiques élevés seraient corrélés à l'arthrose, SIRT-1 (sirtuine 1) : protecteur de l'arthrose.

Modèle	Traitement	Résultats	Références
PROCYANIDINES			
<i>In vivo</i> (souris méniscectomie)	Procyanidine B3 1mg/10g, 5 jours/semaine, 4 semaines	<ul style="list-style-type: none"> ↘ score arthrose (Mankin) ↘ épaisseur de la capsule ↘ mort des chondrocytes ↘ expression iNOS 	(Aini <i>et al.</i> 2012)
Clinique	Pycnogenol® 150mg/jour,	↗ score WOMAC	(Cisar <i>et al.</i>

(100 inclusions)	3 mois versus placebo	↘ douleur	2008)
Clinique	Pycnogenol® 100mg/jours,	↗ score WOMAC	(Belcaro <i>et al.</i>
(156 inclusions)	3 mois versus placebo	↗ mobilité	2008)
Clinique	Pycnogenol® 100mg/jours,	↘ radicaux libres plasmatiques	(Belcaro <i>et al.</i>
(55 inclusions)	3 mois versus placebo	↘ CRP plasmatique	2008)
HYDROXYTYROSOL			
<i>In vitro</i>		↘ production ROS	
(chondrocytes)		↘ expression d'iNOS, COX2, MMP-13, RUNX-2 et VEGF	(Facchini <i>et al.</i>
		↗ expression de SIRT-1	2014)
Clinique	Hydroxytyrosol	↘ douleur	(Takeda <i>et al.</i>
(25 inclusions)	50,1mg/jour, 4 semaines versus placebo		2013)

Bien que ces études soient encourageantes, elles ne permettent pas actuellement d'avoir une vision complète des effets et des mécanismes d'action de ces deux composés phénoliques dans la prévention ou le traitement de l'arthrose. Dans ce contexte, cette étude s'est orientée vers l'analyse des effets d'extraits d'olives et de raisins concentrés en hydroxytyrosol et en procyanidines dans la prévention nutritionnelle de l'arthrose. Nous avons également recherché à évaluer si les effets des deux extraits, utilisés en association, pouvaient offrir un avantage thérapeutique par rapport à l'utilisation des composés seuls. Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons évalué les effets chondroprotecteurs ainsi que le mode d'action des extraits dans des modèles de chondrocytes isolés et des explants de cartilage humain. Par la suite et dans une perspective clinique, la biodisponibilité et la bioactivité de l'hydroxytyrosol et des procyanidines après ingestion ont été étudiées chez le lapin et le chien. Enfin, l'effet préventif d'un traitement avec les extraits a été appréhendé dans des modèles reproduisant expérimentalement une arthrose par chirurgie chez la souris et le lapin.

III- DONNÉES EXPERIMENTALES

La partie expérimentale de ce travail de thèse s'articulera autour de deux articles complémentaires (articles 2 et 3).

Le premier article fera l'objet d'une étude *in vitro* et *ex vivo* au cours de laquelle nous avons évalué les effets de l'hydroxytyrosol et des procyanidines (seuls ou en association) sur des chondrocytes isolés et des explants de cartilage, suite à un traitement à l'IL-1 β . Pour cela, des paramètres associés à l'inflammation (NO, PGE2) et au catabolisme (MMP-13) de l'arthrose ont été évalués. Nous avons également cherché à déterminer la voie de signalisation impliquée en explorant la voie NF- κ B. Enfin, dans une perspective préclinique, nous avons évalué la biodisponibilité et la bioactivité des extraits après administration orale. Pour cela, nous avons cherché à identifier les extraits sous forme de métabolites dans la circulation sanguine après ingestion chez le lapin grâce à des méthodes d'extractions et d'analyse des composés phénoliques par UPLC-MS. Ce travail a ensuite consisté à déterminer si les métabolites présents dans des séras de lapins et de chiens étaient susceptibles de conserver leur effets anti-IL-1 β .

Le second article viendra compléter l'étude *in vitro* et *ex vivo* par une approche intégrée dans des modèles d'arthrose post-traumatique chez la souris et le lapin. Dans ces modèles précliniques, les effets préventifs des extraits sont comparés à ceux de la glucosamine, actuellement commercialisée. Cette partie du travail nous a permis de confirmer l'effet bénéfique de la prévention nutritionnelle de l'arthrose à l'aide d'extraits d'hydroxytyrosol et de procyanidines.

ARTICLE 2

Procyanidins/hydroxytyrosol association and their *in vivo* metabolites exhibit anti-IL-1 β activities: potential application to osteoarthritis treatment

Elsa Mével, Christophe Merceron, Stéphanie Krisa, Tristan Richard, Martial Masson, Olivier Gauthier,
Olivier Hamel, Yohann Wittrant, Nelly Urban, Laurent Beck*, Jérôme Guicheux*

(*equally contributing authors)

Rheumatology (soumis 2015)

Article 2: Procyanidins/hydroxytyrosol association and their *in vivo* metabolites exhibit anti-IL-1 β activities: potential application to osteoarthritis treatment – Rheumatology (soumis)

Résumé:

Des études de plus en plus nombreuses indiquent que les olives et les raisins exercent une activité bénéfique sur la santé, notamment grâce aux composés phénoliques qui les constituent. Parmi ces composés phénoliques, l'hydroxytyrosol et les procyanidines se révèlent particulièrement intéressants dans la prévention des maladies liées à l'âge. Forts de ce constat, l'objectif de cette première étude expérimentale a été de déterminer si l'hydroxytyrosol et/ou les procyanidines, exercent des effets protecteurs vis-à-vis de l'arthrose.

Dans un premier temps, il s'agit de tester si les extraits pourraient avoir une action chondroprotectrice *in vitro*. Pour cela, des chondrocytes humains ou de lapin ainsi que des explants de cartilage humain stimulés à l'IL-1 β ont été utilisés pour tester les effets chondroprotecteurs des extraits (Figure 14). Nous avons également cherché à déterminer la voie de signalisation impliquée dans les effets anti-IL-1 β des extraits par immunofluorescence.

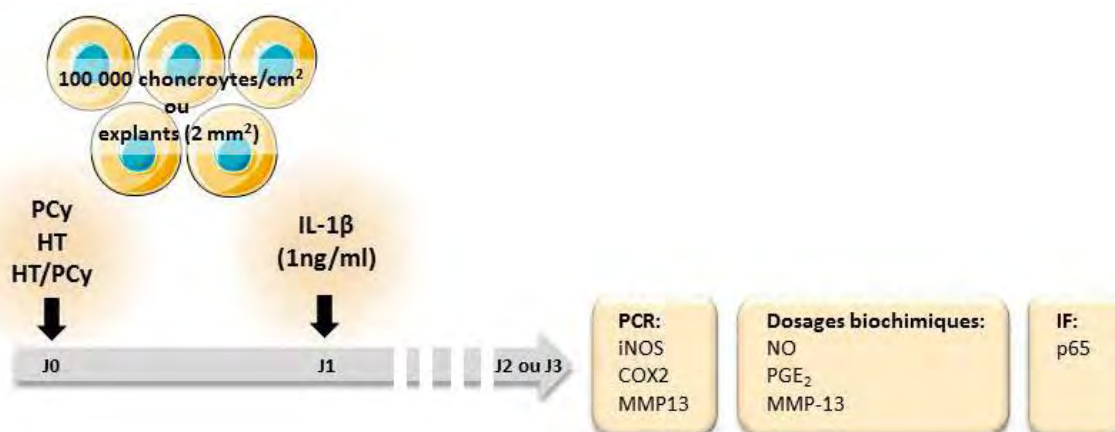


Figure 14 : Schéma expérimental de l'approche *in vitro*. PCy : procyanidines ; HT : hydroxytyrosol

Ensuite, une approche originale *in vivo* a permis de définir plus précisément si les extraits sont biodisponibles dans le sang et s'ils conservent leurs activités biologiques après ingestion par voie orale chez les animaux (Figure 15). Cette approche plus physiologique permet de respecter la biologie générale des composés phénoliques (*i.e.* prise en compte des modifications subies dans le système digestif avant de rejoindre la circulation sanguine générale).

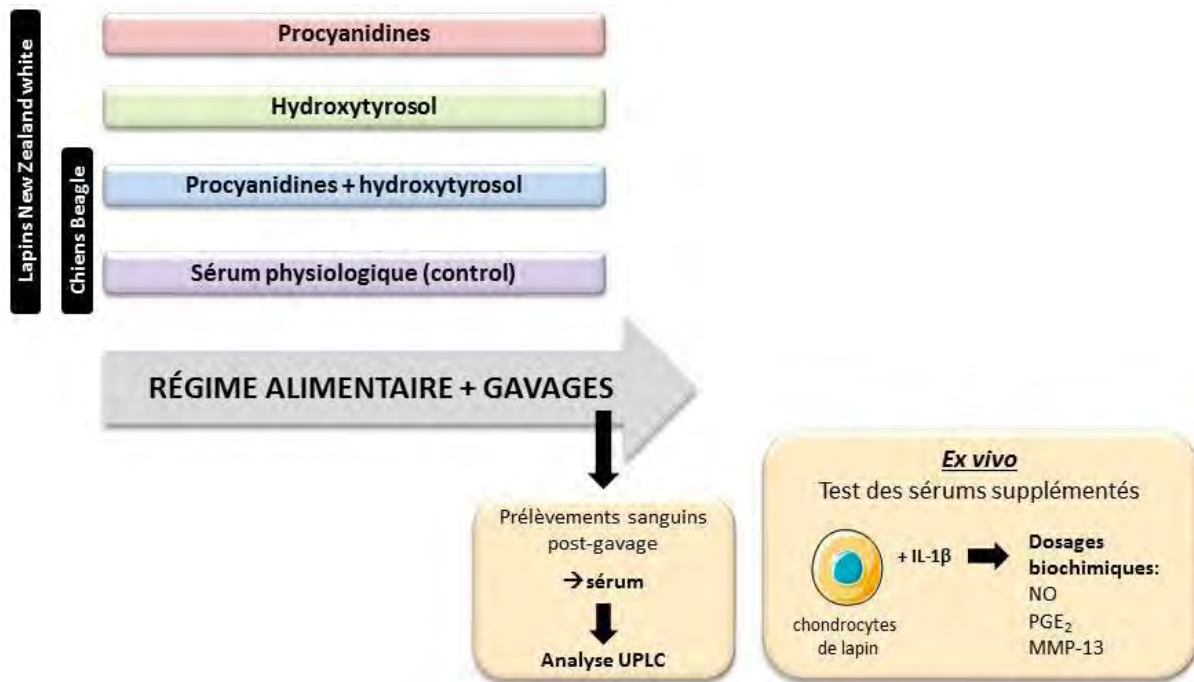


Figure 15 : Schéma expérimental de l'approche *ex vivo*.

Ce travail a permis de démontrer que les extraits exercent une action anti-arthrosique dans modèles de chondrocytes isolés et d'explants de cartilage. Cet effet bénéfique implique une diminution des médiateurs de l'inflammation et du catabolisme par l'inhibition de la voie NF-kB (translocation nucléaire de l'unité p65). À cela s'ajoute la capacité des extraits à être biodisponibles dans la circulation sanguine et à conserver leur bioactivité chondroprotectrice après ingestion dans des modèles animaux ayant un régime alimentaire soit herbivore (lapin) soit omnivore (chien) (Figure 16).

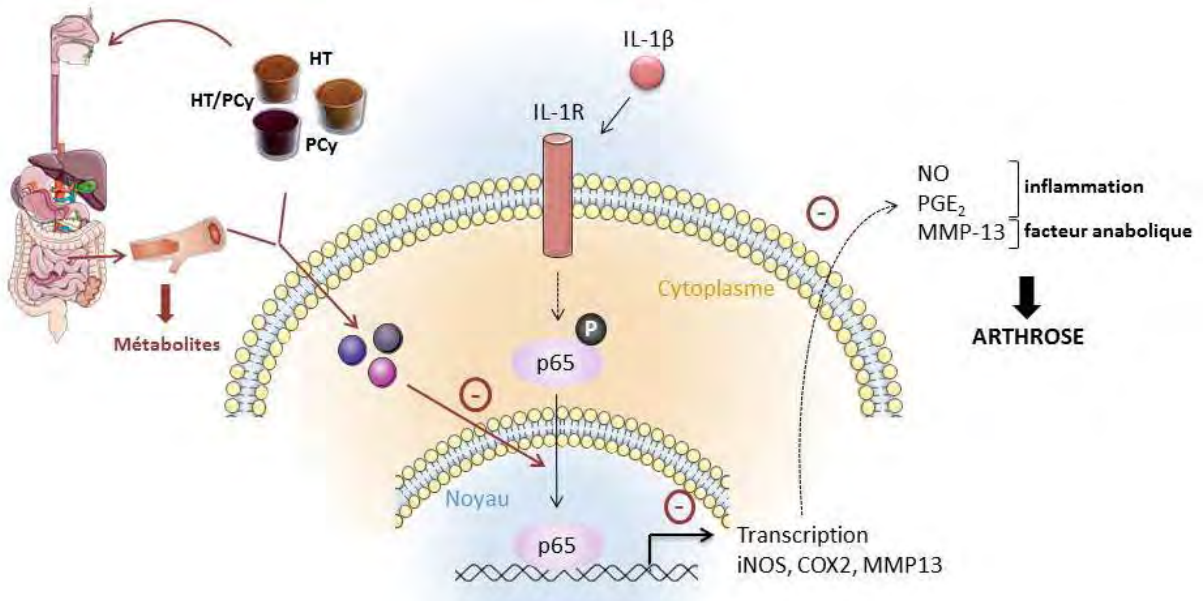


Figure 16 : Effets anti-IL-1 β des procyanidines et l'hydroxytyrosol seuls ou en association ainsi que leurs métabolites *in vivo* dans les chondrocytes.

Procyanidins/hydroxytyrosol association and their in vivo metabolites exhibit anti-IL-1 β activities: potential application to osteoarthritis treatment

Journal:	<i>Rheumatology</i>
Manuscript ID:	RHE-15-1341
Manuscript Type:	Original Article (includes systematic reviews)
Date Submitted by the Author:	01-Sep-2015
Complete List of Authors:	Mével, Elsa; INSERM U791, skeletal tissue engineering and physiopathology Merceron, Christophe; INSERM U791, skeletal tissue engineering and physiopathology Krisa, Stéphanie; EA 3675, GESVAB Richard, Tristan; EA 3675, GESVAB Masson, Martial; INSERM U791, skeletal tissue engineering and physiopathology Gauthier, Olivier; ONIRIS, CRIP Hamel, Olivier; CHU Nantes, Service de neurotraumatologie Wittrant, Yohann; Clermont Université, unité de nutrition humaine Urban, Nelly; Union Grap'Sud, R & D - Qualité Beck, Laurent; INSERM U791, skeletal tissue engineering and physiopathology Guicheux, Jerome; INSERM U791, skeletal tissue engineering and physiopathology
Keywords Please select a minimum FIVE keywords from the list provided. These keywords will be used to select reviewers for this manuscript. The keywords in the main text of your paper do not need to match these words.:	Osteoarthritis < RHEUMATIC DISEASES, Cartilage < TISSUES, Chondrocytes < BASIC & CLINICAL SCIENCES, Cytokines and inflammatory mediators < BASIC & CLINICAL SCIENCES, Inflammation < BASIC & CLINICAL SCIENCES, Metalloproteinases < BASIC & CLINICAL SCIENCES, Molecular biology < BASIC & CLINICAL SCIENCES, Pharmacology < BASIC & CLINICAL SCIENCES, Biological therapies < THERAPIES, Metabolomics < DIAGNOSTIC METHODS

1
2
3 **Procyanidins/hydroxytyrosol association and their *in vivo* metabolites exhibit anti-IL-1 β**
4 **activities: potential application to osteoarthritis treatment**
5
6
7
8
9

10 Elsa Mével^{1,2,3}, Christophe Merceron^{1,3}, Stéphanie Krisa⁴, Tristan Richard⁴, Martial Masson^{1,3}, Olivier
11 Gauthier^{1,3,5}, Olivier Hamel^{1,3,6,7}, Yohann Wittrant^{8,9}, Nelly Urban², Laurent Beck^{1,3*}, Jérôme
12 Guicheux^{1,3,10*}
13
14
15
16
17

18 ¹INSERM, UMRS 791-LIOAD, “Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology” team, Nantes,
19 France.
20

21 ²Union Grap’Sud, Cruviers-Lascours, France.
22

23 ³Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, France.
24

25 ⁴Université de Bordeaux, ISVV, EA 3675 GESVAB, Villenave d’Ornon, France
26

27 ⁵Center for Preclinical Research and Investigation of the ONIRIS Nantes-Atlantic College of
28 Veterinary Medicine, Food Science and Engineering (CRIP), Nantes, France
29

30 ⁶Université de Nantes, UFR Médecine, Nantes, France.
31

32 ⁷CHU de Nantes, Service de Neurotraumatologie, Nantes, France
33

34 ⁸Clermont Université, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France.
35

36 ⁹INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France.
37

38 ¹⁰CHU Nantes, Pôle Hospitalo-Universitaire 4 OTONN, Nantes, France.
39

40 *These authors contributed equally to this article
41

42 **Corresponding author:**

43 Jérôme Guicheux

44 INSERM U791

45 Faculté d’Odontologie

46 1 Place Alexis Ricordeau

47 44042 Nantes cedex 1

48 France
49

50 Phone: +33-(0)2-40412919; Fax: +33-(0)2-40083712
51

52 Email: jerome.guicheux@inserm.fr
53
54
55

56 **Running title:** Anti-inflammatory effects of procyanidins and hydroxytyrosol on chondrocytes
57
58
59
60

Abstract

Objective: Polyphenols exert a large range of beneficial effects in the prevention of age-related diseases. We sought to determine whether hydroxytyrosol (HT) and/or procyanidins (PCy) extracts, major polyphenols found in grape and olive, exert anti-osteoarthritic effects. We evaluated whether a combination of HT and/or PCy could (i) have *in vitro* chondroprotective action, (ii) conserve their bioactivities after oral ingestion in animals.

Methods: Rabbit or human chondrocytes and human cartilage explants stimulated by interleukin-1 (IL-1 β) were used to test chondroprotective effects of extracts. Real-time PCR was performed to monitor the expression of transcripts for inflammatory (iNOS, COX2) and catabolic (MMP13) markers. The related products (NO, PGE₂ and MMP-13) were measured. Extract effects on the NF- κ B signaling pathway were assessed by immunofluorescence. Polyphenol metabolites found in sera of rabbits fed with extracts were analyzed by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. The anti-IL-1 β effects of sera from rabbits and dogs were evaluated.

Results: Extract treatments resulted in a chondroprotective action in isolated chondrocytes and cartilage explants. Extracts significantly reduced the IL1- β -induced levels of iNOS, COX2 and MMP13 transcripts and the production of related NO, PGE₂ and MMP-13. In addition, extracts inhibited the IL-1 β -induced nuclear translocation of NF- κ B p65. Metabolites derived from extracts were found in sera and were found to conserve their anti-IL-1 β effects.

Conclusion: Our data demonstrated that HT and/or PCy exerted anti-osteoarthritic effects involving a decrease in inflammatory and catabolic mediators through the inhibition of NF- κ B pathway. Finally, extracts were found to be bioavailable and bioactive after oral consumption in herbivore and omnivore animal models.

Keywords: nutraceuticals, osteoarthritis, inflammation, procyanidins, hydroxytyrosol, bioavailability, olive extract, grape seed extract

Key messages

1. Hydroxytyrosol and/or procyanidins exhibit anti-IL-1 β effects on chondrocytes and cartilage explants through the NF- κ B pathway.
2. Serum from animals fed with hydroxytyrosol and/or procyanidins extracts contained metabolites and conserved their anti-IL-1 β effects.

Introduction

Despite recent advances in the understanding of the molecular processes involved in osteoarthritis (OA), curative treatments are still lacking. Pharmacological drugs currently available to OA patients thus only alleviate inflammation and pain but do not succeed to slow down, stop or reverse the progression of the cartilage degradation and other tissue damages (1). In this context, there is a growing interest in developing novel anti-osteoarthritic strategies impeding both inflammation and joint degeneration of OA. Interestingly, numerous studies have recently highlighted the potential of natural compounds including nutraceuticals, to slow down or treat OA, thereby paving the way of new therapeutic routes (2-11). However, before nutraceuticals can enter the daily therapeutic arsenal of clinicians, a large number of prerequisites should be addressed including notably the *in vivo* bioactivity of such compounds in relevant animal models of OA and their bioavailability after ingestion.

Among these nutraceuticals, hydroxytyrosol (HT) and procyanidins (PCy) are active polyphenols found in many plants, including grape and olive. They exert antioxidant activity and inhibit the synthesis of numerous inflammatory mediators (12-14). It has thus been shown that PCy had the ability to alleviate inflammation *in vitro* and *in vivo* through the inhibition of nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE₂) and interleukin-1 beta (IL-1 β) production (15, 16) and to slow down cartilage degradation in a murine model of OA (17). In addition, oral intake of HT is also reported to decrease *in vivo* inflammation through the inhibition of PGE₂ and NO production (13). Of note, HT has also the ability to relieve pain as described in a double-blind placebo-controlled trial conducted on 25 patients with knee OA (18). Whereas their powerful anti-inflammatory properties make HT and PCy promising

1
2
3 candidates for the treatment of OA, their combined effects, bioavailability after oral intake and the
4
5 bioactivity of their metabolites have not yet been demonstrated.

6
7 With respect to the large spectrum of OA symptoms ranging from proteases-mediated cartilage
8
9 degradation to IL-1 β -induced joint inflammation, the optimal treatment for OA would be a therapy
10
11 that can not only reverse the progressive degeneration of osteo-articular tissues but also improve the
12
13 relief of pain-associated inflammation.

14
15 In light of the promising data regarding the PCy and HT effects, we were interested in deciphering
16
17 whether a combination of natural HT and PCy, in comparison with the isolated compounds, could
18
19 concomitantly exhibit anti-inflammatory and anti-catabolic effects. To address this issue, we used
20
21 freshly isolated human and rabbit articular chondrocytes and cartilage explants. In these
22
23 complementary models, we tested whether HT, PCy and HT/PCy extracts decrease the IL-1 β -induced
24
25 levels of inflammatory and catabolic markers including NO, PGE₂ and MMP-13. We also sought to
26
27 determine the signaling pathways underlying the anti-IL-1 β effects of extracts. Finally, in a clinical
28
29 perspective, we embarked on *in vivo* experiments to evaluate the anti-IL-1 β effects of sera from rabbits
30
31 and dogs fed with extracts.
32

33 34 35 **Materials and methods**

36 37 *Preparation of extracts solutions*

38
39 The Olivex[®], an olive extract (HT), Exgrape[®]SEED, a grape seed extract (PCy) and Oleogrape[®]SEED,
40
41 an extract from olive and grape seed (HT/PCy) were provided by Grap'Sud Union (Cruviers Lascours,
42
43 France). Their respective compositions are given in supplementary data (Table 1). The extracts were
44
45 dissolved in Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (Life Technologies,
46
47 Carlsbad-CA, USA). Solutions were sterilized by filtration through 0.22 μ m membranes.
48

49 50 51 *Rabbit and human primary chondrocyte isolation*

52
53 Rabbit and human articular chondrocytes (RAC and HAC) were harvested from tibial plateau and
54
55 femoral condyles of New Zealand White rabbits, and human cadavers as previously described (19).
56
57
58
59
60

1
2
3 Cells were plated at passage 1 in 96-well plates at a density of 100,000 cells/cm² and maintained at
4
5 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in control medium.
6
7

8 9 *Cartilage explant isolation*

10
11 Explants of human articular cartilage were aseptically removed from the tibial plateau and femoral
12
13 condyles of cadavers. Full-thickness cartilage cylinders were obtained from the articular surface using
14
15 a 2-mm biopsy punch (Kai Medical Inc., Honolulu-HI, USA) and cultured in control medium.
16
17

18 19 *Culture treatments*

20
21 Cells and explants were treated with human recombinant IL-1 β (Millipore Corporation, Billerica-MA,
22
23 USA) at 1ng/ml for the indicated times. To analyze the effects of extracts, cells and explants were pre-
24
25 incubated for 24h in the presence of extracts at the indicated concentrations before being treated with
26
27 IL-1 β .
28
29

30 31 *NO, PGE₂ and MMP-13 measurements*

32
33 Nitrate/Nitrite colorimetric assay kit and Prostaglandine E₂ EIA kit – Monoclonal were obtained from
34
35 Cayman Chemical (Ann Arbor-MI, USA), Rabbit ELISA Kit for MMP-13 were purchased from
36
37 Cloud-Clone Corp (Houston-TX, USA) and Human ELISA kit for MMP-13 were obtained from
38
39 Abcam[®] (Cambridge, UK). The NO, PGE₂ and MMP-13 levels measurements were performed
40
41 according to manufacturer's instructions.
42
43

44 45 *RNA extraction and real-time PCR*

46
47 RNA was extracted using NucleoSpin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to
48
49 the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using SuperScript III Reverse
50
51 Transcriptase (Life Technologies). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using
52
53 SuperScript[®] III First-Stand Synthesis SuperMix (Life Technologies) on the Mx3000P[®] QPCR System
54
55 (Agilent Technologies, Santa Clara-CA, USA). PCR primers were synthesized by Eurofins DNA
56
57
58
59
60

1
2
3 Genomics (Ebersberg, Germany) and sequences are reported in supplementary Table 2. β -actin and
4 GUSB were used as reference genes and results were expressed as relative expression levels using the
5 Livak method (20).
6
7

8 9 10 11 *Immunofluorescence analyses*

12 Human chondrocytes and cartilage explants were fixed in Phosphate Buffered Saline (PBS) (Life
13 Technologies) containing 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Science, Hatfield-PA,
14 USA). Immunofluorescences were performed on human chondrocytes and cartilage explants with
15 specific anti-NF- κ B p65 primary antibodies (1:50, Cell Signaling Inc., Danvers-MA, USA). Samples
16 were incubated with Alexa Fluor[®] 488-conjugated secondary antibody (1:1000, Life Technologies).
17 Cells nuclei were stained with Hoechst 33258 Molecular Probes[®] (Life Technologies). Cartilage
18 samples were counterstained with Phalloidin 594-conjugated at 1:50 in PBS for 72h. Fluorescence on
19 HAC was visualized using Cellomics ArrayScan VTI High Content Screening (HCS) Reader
20 microscope (Thermo Scientific, Waltham-MA, USA). Cells with positive nuclear fluorescence signal
21 were manually counted with FIJI software. Results are expressed as percentage of cells positive for
22 p65 nuclear signal. Fluorescence in cartilage explants was visualized with a single plane illumination
23 microscope Z1 Lightsheet (21) (Zeiss, Marly-Le-Roi, France). Data processing and volume
24 reconstruction were done on Zen Black 2014 (Zeiss) and FIJI softwares.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 *Rabbits and dogs feeding and sera collection*

42 All animal procedures were approved by the institution's animal welfare committee (CEEA Pays de la
43 Loire. Agreement n°02099.01) and were conducted in accordance with the European's guidelines for
44 the care and use of laboratory animals (2010/63/UE). Rabbits were housed in the animal facility of
45 Faculty of Medicine (Agreement n°C44015) and dogs were hosted in Centre for Research and
46 Preclinical Investigation (ONIRIS Agreement n° E44271). Twelve 15 week-old female New Zealand
47 white rabbits were purchased from Hypharm-Grimaud (Roussay, France) and five 2 to 4 years-old
48 beagle dogs were obtained from CEDS (Mézilles, France). Rabbits were randomly divided into 4
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 groups (n=3 per group) and dogs in 2 groups (n=2 for control group and n=3 for treated group).
4
5 Control group was fed with saline solution NaCl 0.9% (Sigma-Aldrich) (1mL/kg). Experimental
6
7 groups received HT, PCy and/or HT/PCy every day during 6 or 7 days as indicated. Extracts were
8
9 administrated by gavage at the dose of 100mg/kg or 500mg/kg. Venous blood was collected,
10
11 centrifuged and sera were stored until use in cell culture and UPLC-MS experiments. For cell culture
12
13 experiments RAC were pretreated with 2.5% of sera in DMEM (2.5% FCS, 1% P/S) following by 24h
14
15 of IL-1 β treatment.
16
17

18 19 *Phenolic compounds extraction from serum*

20
21 Sera from rabbit fed as described above were mixed with methanol and ultrasonicated. The mixture
22
23 was centrifuged at 20,000g for 10 min. The supernatant was separated and evaporated to dryness using
24
25 a SpeedVac Concentrator. The dried extract was reconstituted in methanol/water (50:50 v/v). After
26
27 centrifugation (20,000g for 10 min), the supernatant was filtered through a PTFE 0.22 μ m filter
28
29 (Millipore Corporation) and stored until use.
30
31

32 33 *Ultra-high performance liquid chromatography–mass spectrometry*

34
35 Phenolic compounds analyses were carried out using a 1290 Infinity UPLC from Agilent
36
37 Technologies. The UPLC system was coupled to an Esquire 3000 plus mass spectrometer from Bruker
38
39 Daltonics (Wissembourg, France). Column Zorbax SB-C18 (2.1 \times 100mm, 1.8 μ m) from Agilent
40
41 Technologies was used. Two different solvents were used as a mobile phase: solvent A (water/formic
42
43 acid 99.9:0.1 v/v) and solvent B (acetonitrile/formic acid 99.9:0.1 v/v), at a flow rate of 0.4 mL/min
44
45 and a gradient as follows: 0 min 1% B, 0.4 min 1% B, 2 min 10% B, 6 min 35% B, 7 min 50% B, 8.8
46
47 min 70% B, 10.8 min 92% B, 11 min 100% B, 12 min 100% B, 12.2 min 1% B, 15.2 min 1% B. The
48
49 MS/MS parameters were as follows: negative mode; capillary tension +4000V; nebulizer 40 psi; dry
50
51 gas 10 L/min; dry temperature 365°C; and scan range m/z 100 to 1400. Data were processed using
52
53 HyStar 3.2 software (Bruker Daltonics).
54
55
56
57
58
59
60

Statistical analysis

Each experiment was performed at least in triplicate. Results are expressed as mean \pm SEM.

Comparative studies were analyzed using an ANOVA test followed by post-hoc Fisher test with P values less than 0.05 considered as statistically significant.

Results

Extracts effects on IL-1 β -induced iNOS, COX2, MMP13 transcript and NO, PGE₂, MMP-13 production in RAC and HAC.

After confirming that the extracts did not alter cell viability (data not shown), we were interested in evaluating whether HT, PCy and HT/PCy extracts can modulate the IL-1 β -dependent levels of gene expression involved in inflammation and degradation processes in cartilage. Chondrocytes were pretreated with HT, PCy and HT/PCy extracts at 10X concentration for 24h and stimulated or not with IL-1 β (1ng/mL) for 24h and the induced levels of iNOS, COX2 and MMP13 transcripts were measured (Figure 1). Our Results show a significant decrease in IL-1 β -induced iNOS, COX2 and MMP13 expression levels in rabbit (Fig. 1A, B and C) and human (Fig. 1D, E and F) chondrocytes pretreated with the extracts. Consistently, the IL-1 β dependent NO, PGE₂ and MMP-13 production were also decreased by the extracts in RAC (Fig. 2A to C) and in HAC (Fig. 2D to F). Interestingly, PCy and HT/PCy extracts totally blocked the MMP-13 production in RAC (Fig. 2C). Similarly, HT/PCy extracts completely blunted the effect of IL-1 β on the PGE₂ production in HAC (Fig. 2E).

Extracts effects on IL-1 β -induced NO, PGE₂ and MMP-13 production in cartilage explants.

After having demonstrated that the extracts markedly affected the IL-1 β -induced levels of NO, PGE₂ and MMP-13 in chondrocytes, we questioned whether the extracts may also affect inflammation and catabolism hallmarks in chondrocytes physiologically embedded in their extracellular matrix. For this purpose, human cartilage explants were pre incubated with HT, PCy and HT/PCy extracts for 24h prior to IL-1 β treatment for 48h. As expected, IL-1 β treatment triggered a significant increase in the

1
2
3 NO (Fig. 3A), PGE₂ (Fig. 3B) and MMP-13 (Fig. 3C) production in explant supernatants as compared
4 to the unstimulated condition. HT, PCy and HT/PCy extracts respectively down-regulated by
5 approximately 50% the NO production induced by IL-1 β (Fig. 3A). Interestingly, the three extracts
6 almost completely blunted the effect of IL-1 β on PGE₂ production (Fig. 3B) and of note, only the
7 HT/PCy extract almost completely aborted the effect of IL-1 β on MMP-13 production.
8
9
10
11
12
13
14
15

16 *Extracts effects on IL-1 β -mediated activation of NF- κ B p65 signaling pathway*

17
18 NF- κ B is an essential transcriptional regulator of IL-1 β -activated inflammatory and catabolic
19 mediators such as NO, PGE₂ and MMP-13. We were thus interested in determining whether this IL-
20 1 β -activated signaling pathway may be regulated in human chondrocytes and explants and whether
21 our extracts may modulate this pathway. After 24h in culture with extracts at a 10X concentration
22 followed by 24 or 48h stimulation with IL-1 β (1ng/mL), the NF- κ B p65 subunits were visualized by
23 immunofluorescence assay on HAC and human cartilage explants (Fig. 4). In untreated condition,
24 isolated and embedded human chondrocytes exhibited only cytoplasmic labelling of p65 while in
25 treated conditions with IL-1 β , there was a positive nuclear staining for p65 and to a lesser extent in the
26 cytoplasm of chondrocytes, indicating nuclear translocation (Fig. 4A and B). Pretreatment with
27 extracts induced a positive labelling in the cytoplasm and a decrease in the nuclear staining of p65
28 following IL-1 β treatment (Fig. 4A and B). Chondrocytes with positive nuclear staining were
29 manually scored and Figure 4C shows that extracts down-regulated by approximately 70% the total
30 number of chondrocytes with a nuclear staining induced by IL-1 β .
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 *Mass spectrometry identification of phenolic metabolites in rabbit serum*

49 After having demonstrated that extracts may reduce the IL-1 β effects in chondrocytes and cartilage
50 explants, we questioned whether the serum of rabbits fed with extracts may contain the regular
51 metabolites of phenolic compounds. The metabolites from rabbits sera were identified by UPLC-MS
52 from the phenolic extracts of HT and PCy are reported in Table 1. All metabolites were identified by
53 the peak t_R (min) and the transition of m/z [M - H]⁻. In serum of rabbits fed with HT, five metabolites
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 were identified. Two HT derivatives were detected as hydroxytyrosol glucuronide and as
4 hydroxytyrosol sulfate, as reported in previous studies (22, 23). In addition, two tyrosol derivatives
5 were also identified as tyrosol glucuronide and as tyrosol sulfate, as previously reported (24). Finally,
6 homovanillic acid sulfate was identified (22, 24). Regarding rabbits fed with PCy extract, nine
7 metabolites were detected. Four catechin derivatives were identified. The peaks with the transitions
8 were attributed to catechin glucuronide, catechin sulfate, methyl-catechin glucuronide and methyl-
9 catechin sulfate, respectively (25, 26). Two epicatechin derivatives were identified and were attributed
10 to epicatechin glucuronide and epicatechin sulfate, respectively (25, 26). In addition to
11 proanthocyanidins, three other metabolites were detected and identified as
12 dihydroxyphenylvalerolactone sulfate, as previously reported (27, 28), as dihydroxyphenylvaleric acid
13 sulfate (27), and finally as hydroxyphenylpropionic acid (27, 29). All identified metabolites in rabbit
14 serum fed with HT or PCy extracts have also been found in serum of rabbits fed with HT/PCy extract.
15 These results suggested the transformation by conjugations and the bioavailability of the extracts in
16 serum after oral intake.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 *Analysis of the anti-IL-1 β effects of sera*

34
35
36 To investigate the preservation of the anti-IL-1 β effects of extracts after oral intake, we fed rabbits and
37 dogs with the three extracts and tested whether their sera exhibited anti-IL-1 β effects in RAC models.
38 Serum from rabbit fed with HT, PCy and HT/PCy extracts respectively down regulated by 35-40% the
39 NO production induced by IL-1 β in RAC as compared to cells treated with serum from rabbit fed with
40 saline (Fig. 5A). Similarly, serum from rabbit fed with HT, PCy and HT/PCy extracts decreased by
41 about 40% the PGE₂ release triggered by IL-1 β in RAC compared to control (Fig. 5B). Of interest,
42 while the IL-1 β -induced level of MMP-13 was moderately reduced (30%) by serum from rabbit fed
43 with HT or PCy alone, serum from rabbit fed with HT/PCy extracts almost completely abolished
44 MMP-13 production. In addition, the sera from dogs collected 15 minutes after the last gavage
45 decreased the NO production triggered by IL-1 β in comparison with the serum harvested before the
46 start of the experimentation (Fig. 5D). Two hour after gastric gavage, sera from dogs are still bioactive
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and reduced the PGE₂ and MMP-13 production in the RAC model (Fig. 5 E and F). Taken together,
4 these results indicate that HT, PCy and HT/PCy extracts conserved their anti-IL-1 β activities in serum
5 after undergoing digestive process in rabbits and dogs.
6
7
8
9

10 **Discussion**

11
12 Despite OA is the most common inflammatory and degenerative joint disease, no curative treatment is
13 available (1, 30). In the search of innovative therapeutics, *in vitro* models recapitulating the
14 inflammatory and degenerative processes are of high value for drug screening. Since IL-1 β is one of
15 the pivotal cytokines involved in OA pathogenesis (31, 32), *in vitro* models of isolated chondrocytes
16 treated with IL-1 β have been widely used to determine whether drugs or natural compounds may
17 exhibit some promise as future interventional treatment in OA (33). In this context, we first embarked
18 on experiments dealing with testing the effects of HT, PCy and HT/PCy extracts on the IL-1 β -induced
19 levels of well-known inflammatory and catabolic hallmarks (34). As previously reported, we found
20 that HT and PCy significantly affect the IL-1 β -induced levels of NO, PGE₂ and MMP-13, and iNOS,
21 COX2 and MMP-13 transcripts as well. Of interest, our data also indicate for the first time that a
22 combination of HT and PCy may reduce more drastically the effects of IL-1 β as compared to HT or
23 PCy alone. Since it is well acknowledged that monolayer cultured chondrocytes rapidly lose their
24 differentiated phenotype (19), we were then interested in testing whether our extracts also inhibited IL-
25 1 β effects in organ culture of cartilage explants allowing chondrocytes to be maintained in their
26 natural environment. Using this model, we demonstrated that extracts more significantly affects the
27 IL-1 β effects in explants as compared to observation in isolated chondrocytes. In addition, while the
28 three extracts almost completely blunted IL-1 β induced PGE₂ production, only the combination of HT
29 and PCy led to a total inhibition of MMP-13 production. All together, these data strongly suggest that
30 a combination of HT and PCy may be more prone to inhibit the inflammatory and catabolic effects of
31 IL-1 β .
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53
54 Among the pathways activated by IL-1 β , the NF- κ B signaling cascade is one of the most largely
55 investigated. After phosphorylation, ubiquitination and degradation of I κ B α , the p65 NF- κ B subunit
56
57
58
59
60

1
2
3 translocate to the nucleus where it binds and activates the promoter of target genes. Nutraceuticals
4 including polyphenols, such as resveratrol (5) are well known to interfere with the IL-1 β dependent
5 activation of the NF- κ B signaling pathway. It has thus been reported that resveratrol blunts the IL-1 β
6 dependent nuclear translocation of the NF- κ B p65 subunit in articular chondrocytes thereby inducing a
7 significant decrease in IL-1 β dependent NO and PGE₂ production (5, 33). Despite a large body of
8 evidence demonstrating the inhibitory effects of phenolic compounds on the NF- κ B signaling
9 pathway, it has not yet been deciphered whether HT and PCy may also interact with the IL-1 β
10 dependent activation of NF- κ B. To address this issue, we then move to experiments dealing with the
11 immunolocalization of the NF- κ B p65 subunit in human articular chondrocytes. As expected, we
12 found that the three extracts dramatically inhibited the nuclear translocation of p65 in isolated
13 chondrocytes treated with IL-1 β . To strengthen the scientific relevance of our data, we then performed
14 experiments in chondrocytes embedded in their extracellular matrix using human cartilage explants.
15 Interestingly and by using an innovative light-sheet microscopic technique, we were the first to
16 demonstrate that human chondrocytes in cartilage explants respond to IL-1 β treatment in term of p65
17 nuclear translocation. Consistently, the three extracts were found to significantly block the nuclear
18 translocation of p65 induced by IL-1 β in this model. Taken together, these data demonstrate that HT
19 and/or PCy alter the IL-1 β dependent chondrocytes response at least through the modulation of the
20 NF- κ B signaling cascade.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 In the perspective of a transfer from bench to bedside, the bioavailability of natural anti-osteoarthritic
41 molecules after oral administration is a key pre-requisite. Surprisingly and despite a huge number of
42 studies dealing with the anti-osteoarthritic properties of nutraceuticals (35), no study directly address
43 the bioactivity or bioavailability of phenolic compound metabolites in the blood stream after ingestion.
44 The systemic bioavailability depends on the various chemical modifications that compounds undergo
45 after absorption from the intestine barrier (*e.g.* deglycosylation, glucuronate modification, and/or
46 conjugation with sulfates) that lead to the formation of metabolites chemically different from the
47 native compound (36, 37). We therefore sought to determine whether the serum of rabbit fed with HT
48 and PCy contains bioactive metabolites of phenolic compounds. To address this issue, two
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 complementary methods have been used. The first direct method consists in identifying the presence
4 of specific and already known metabolites of phenolic compounds by UPLC-MS in collected serum.
5 Accordingly, the sera of rabbits force-fed with HT and/or PCy was found to contain 5 metabolites of
6 HT and 9 of PCy respectively. The second indirect method consists in testing the bioactivity of sera
7 from rabbits force-fed with extracts. In this purpose, sera collected from rabbits force-fed with extracts
8 were found to exhibit an anti-IL-1 β effect in *in vitro* models of cultured chondrocytes. To reinforce the
9 relevance of our *in vivo* data, we then questioned whether the sera from omnivore animals (ie. dogs)
10 exhibiting a general metabolism more closely related to that of human, may also be bioactive. Of
11 interest, our data have clearly indicated that, consistently with the data generated in rabbits, the sera of
12 an omnivore species fed with HT/PCy extracts significantly down-regulated the IL-1 β -induced levels of
13 NO, PGE₂ and MMP-13. Considered together, these results indicate that HT, PCy and HT/PCy
14 conserved their bioactivities in serum after undergoing digestive process in herbivore and omnivore
15 mammals, suggesting that the bioactivity of these compounds may not depend on species specificities.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 Based on the above promising data, it seems reasonable to speculate that HT/PCy extracts may exert a
31 potent *in vivo* anti-osteoarthritis effects. To preclinically address this issue, we are now embarking on
32 experiments in adapted animal models of OA (11). Whether this will offer promising alternatives in
33 the design of novel strategies for the nutraceutical management of OA should deserve further
34 consideration.
35
36
37
38
39

40 To conclude, we demonstrated for the first time that olive and grape extracts containing HT and/or
41 PCy exhibit anti-IL-1 β effects in *in vitro* isolated human and rabbit chondrocytes and in *ex vivo* human
42 articular cartilage explants. Our data also suggest that the effects of extracts were at least in part
43 mediated through the inhibition of the NF- κ B pathway. Finally, we demonstrated that the sera of
44 rabbits and dogs fed with extracts contain phenolic compound metabolites that exhibit anti-IL-1 β
45 activities, thereby indicating that HT and PCy conserve their biological activities in serum after oral
46 consumption.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

The authors are grateful to P. Hulin and S. Nedellec from the MicroPicell platform (SFR François Bonamy, FED 4203/ Inserm UMS 016/CNRS 3556) for their assistance in collecting and analyzing data with the microscope Z1 Lightsheet; S. Beck-Cormier for her advice with immunofluorescence staining; E. Renouf for her assistance in UPLC-MS analysis; B. Fellah, I. Leborgne, and P. Roy (CRIP- ONIRIS) who contributed to dog experiments and P. Monmousseau (UTE Platform; SFR François Bonamy, FED 4203/ Inserm UMS 016/CNRS 3556) who provided help with rabbits experiments. MS and NMR experiments were undertaken at the Metabolome Facility at the Functional Genomic Center in Bordeaux, France.

Author contributions: EM collected data, performed the research, analyzed and interpreted data, study design and drafted the manuscript. CM contributed to collected data, analyzed and interpreted data, study design and gets critical revision of the article for important intellectual content. MM participated in data collection. SK and TR participated in UPLC-MS data collection, analysis and provide help in drafted the manuscript. OG contributed to dog's experiments and fruitful discussions. OH provided human materials. YW participated in study design for the *in vivo* studies. NU obtained funding and provided extracts. JG and LB participated in study design, data analysis and gets critical revision of the article for important intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Grap'Sud, Région Languedoc Roussillon and the BPI the ANRT.

Disclosure statement: NU is an employee of Grap'Sud. The other authors have declared no conflicts of interest.

References

1. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 2009 Oct;14(19-20):913-25.
2. Chen WP, Tang JL, Bao JP, Hu PF, Shi ZL, Wu LD. Anti-arthritic effects of chlorogenic acid in interleukin-1beta-induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. *Int Immunopharmacol* 2011 Jan;11(1):23-8.

3. Chen WP, Hu PF, Bao JP, Wu LD. Morin exerts antiosteoarthritic properties: an in vitro and in vivo study. *Exp Biol Med (Maywood)*2012 Apr;237(4):380-6.
4. Chen WP, Wang YL, Tang JL, Hu PF, Bao JP, Wu LD. Morin inhibits interleukin-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes. *Int Immunopharmacol*2012 Feb;12(2):447-52.
5. 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.
6. Bang JS, Oh da H, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther*2009;11(2):R49.
7. Haseeb A, Chen D, Haqqi TM. Delphinidin inhibits IL-1beta-induced activation of NF-kappaB by modulating the phosphorylation of IRAK-1(Ser376) in human articular chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*2013 Jun;52(6):998-1008.
8. Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J, et al. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*2003 Apr;11(4):290-8.
9. Wang J, Gao JS, Chen JW, Li F, Tian J. Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. *Rheumatol Int*2012 Jun;32(6):1541-8.
10. Phitak T, Pothacharoen P, Settakorn J, Poompimol W, Catterson B, Kongtawelert P. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry*2012 Aug;80:77-88.
11. Mével E, Monfoulet LE, Merceron C, Coxam V, Wittrant Y, Beck L, et al. Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools. *Drug Discov Today*2014 Jun 20;19(10):1649-58.
12. Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*2002 Jan;22(1):65-75.
13. Bitler CM, Viale TM, Damaj B, Crea R. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *J Nutr*2005 Jun;135(6):1475-9.
14. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*1999 Sep;27(5-6):704-24.
15. Pallares V, Fernandez-Iglesias A, Cedo L, Castell-Auvi A, Pinent M, Ardevol A, et al. Grape seed procyanidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats. *Free Radic Biol Med*2013 Jul;60:107-14.
16. Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin*2001 Dec;22(12):1117-20.
17. Aini H, Ochi H, Iwata M, Okawa A, Koga D, Okazaki M, et al. Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. *PLoS One*2012;7(5):e37728.
18. Takeda R, Koike T, Taniguchi I, Tanaka K. Double-blind placebo-controlled trial of hydroxytyrosol of *Olea europaea* on pain in gonarthrosis. *Phytomedicine*2013 Jul 15;20(10):861-4.
19. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials*2005 Nov;26(33):6643-51.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*2001 Dec;25(4):402-8.
21. Weber M, Mickoleit M, Huisken J. Light sheet microscopy. *Methods Cell Biol*2014;123:193-215.
22. Rubió L, Macià A, Valls RM, Pedret A, Romero M-P, Solà R, et al. A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. *Food Chem*2012 9/15;134(2):1132-6.

- 1
2
3 23. Suárez M, Romero M-P, Macià A, Valls RM, Fernández S, Solà R, et al. Improved method for
4 identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by
5 microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J*
6 *Chromatogr B*2009 12/15/;877(32):4097-106.
- 7 24. de la Torre-Carbot K, Jauregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Covas M-I, Casals I, et
8 al. Rapid high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass
9 spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil phenolic metabolites
10 in human low-density lipoproteins. *J Chromatogr A*2006 5/26/;1116(1–2):69-75.
- 11 25. Arola-Arnal A, Oms-Oliu G, Crescenti A, del Bas JM, Ras MR, Arola L, et al. Distribution of
12 grape seed flavanols and their metabolites in pregnant rats and their fetuses. *Mol Nutr Food*
13 *Res*2013;57(10):1741-52.
- 14 26. Serra A, Macià A, Romero M-P, Piñol C, Motilva M-J. Rapid methods to determine
15 procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-
16 tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*2011 6/1/;879(19):1519-28.
- 17 27. Mateos-Martín ML, Pérez-Jiménez J, Fuguet E, Torres JL. Non-extractable proanthocyanidins
18 from grapes are a source of bioavailable (epi)catechin and derived metabolites in rats. *Br J*
19 *Nutr*2012;108(02):290-7.
- 20 28. Urpi-Sarda M, Monagas M, Khan N, Llorach R, Lamuela-Raventós RM, Jáuregui O, et al.
21 Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by
22 liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*2009 10/23/;1216(43):7258-67.
- 23 29. Goodrich KM, Neilson AP. Simultaneous UPLC–MS/MS analysis of native catechins and
24 procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth
25 inbred rats. *J Chromatogr B*2014 5/1/;958(0):63-74.
- 26 30. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical
27 practice. *Lancet*2011 Jun 18;377(9783):2115-26.
- 28 31. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*2000
29 Sep;43(9):1916-26.
- 30 32. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory
31 cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*2011 Jan;7(1):33-42.
- 32 33. Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by
33 resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol*2008 Feb 1;75(3):677-87.
- 34 34. Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, et al. The catabolic pathway mediated by
35 Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*2006 Jul;54(7):2152-63.
- 36 35. Henrotin Y, Lambert C, Couchourel D, Ripoll C, Chiotelli E. Nutraceuticals: do they represent a
37 new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five
38 products. *Osteoarthritis Cartilage*2011 Jan;19(1):1-21.
- 39 36. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and
40 bioavailability. *Am J Clin Nutr*2004 May;79(5):727-47.
- 41 37. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M.
42 Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin*
43 *Pharmacol*2013 Mar;75(3):588-602.
- 44
45
46
47
48
49

50 Tables and figures legends

51 Figure 1: HT, PCy and HT/PCy effects on iNOS, COX2 and MMP13 expression

52 RAC and HAC were cultured 24h with HT, PCy or HT/PCy and treated 24h with IL-1 β (1ng/mL). The
53
54 expression of iNOS (A and D), COX2 (B and E) and MMP13 (C and F) were evaluated by real time
55
56
57
58
59
60

1
2
3 RT-PCR in RAC (A, B and C) and HAC (D, E and F). # $p < 0.05$ compared to the condition with IL-1 β
4 (1 ng/mL) alone, * $p < 0.05$ compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution.
5
6
7

8
9 **Figure 2: HT, PCy and HT/PCy effects on NO, PGE₂ and MMP-13 production**

10 RAC and HAC were pretreated with HT[®], PCy or HT/PCy during 24h prior to IL-1 β stimulation
11 (1ng/mL) for 24h. NO production was assessed using Greiss reaction, PGE₂ and MMP-13 production
12 were measured using ELISA assay in RAC (A, B and C) and HAC (D, E and F). The MMP-13
13 productions in RAC treated by PCy and HT/PCy were under the detection range. # $p < 0.05$ compared
14 to the condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone, * $p < 0.05$ compared to the condition without IL-1 β with
15 the same extract solution.
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Figure 3: Effect of HT, PCy and HT/PCy on cartilage explants**

26 Human cartilage explants were preincubated with HT, PCy and HT/PCy for 24h and stimulated with
27 IL-1 β (1ng/mL) for 48h. Effect of HT, PCy and HT/PCy on NO (A) and PGE₂ (B) release in culture
28 media was measured. # $p < 0.05$ compared to the condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone, * $p < 0.05$
29 compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution.
30
31
32
33
34
35
36

37 **Figure 4: HT, PCy and HT/PCy effects on the IL-1 β -dependent NF-KB p65 translocation in**
38 **HAC and human cartilage explants**

39 HAC were pretreated for 24h with HT, PCy and HT/PCy and then IL-1 β (1ng/mL) was added to the
40 medium for an additional 24h. Immunofluorescence assay for p65 subunit (A) was performed, and p65
41 positive cells in nucleus was counted (B). Immunofluorescence assay for p65 subunit were performed
42 in cartilage explants (C). In a control condition without treatment, a light cytoplasmic immunostaining
43 was seen with anti-p65 antibody. # $p < 0.05$ compared to the condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone, * p
44 < 0.05 compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Figure 5: Effects of serum from rabbit and dogs fed with HT and/or PCy on the IL-1 β -induced**
4 **levels of NO, PGE₂ and MMP-13 production**

5
6 Rabbits (n=3 per condition) were fed with HT, PCy and HT/PCy (100mg/kg) or saline solution (NaCl)
7 every two days during 6 days and serum were harvested 2 h after the last gastric gavage. Dogs (n=3)
8 were fed with HT/PCy (100mg/kg) each days during 7 days and sera was harvested before (0 min), 30
9 min and 2 h after the last gastric gavage. RAC were cultured during 24h in presence of serum from
10 rabbit (A to C) or dog (D to F) at a final concentration of 2.5% (v/v) and stimulated with IL-1 β
11 (1ng/mL) for an additional 24h. The NO (A and D) and PGE₂ (B and E) and MMP-13 (C and F)
12 released in culture media were measured. # p<0.05 compared to the NaCl condition with IL-1 β (1
13 ng/mL), * p <0.05 compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution, \$ p<0.05
14 compared to the 0 min condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Table 1: Identification of phenolic metabolites in rabbit serum**

28 Rabbits received 6 doses of HT, PCy and HT/PCy (500mg/mL) for 8 days, at the end of the
29 experimentation the serum was harvested. The characterization of the metabolites in the rabbit serum
30 was based on their ion fragmentation in the MS and MS/MS modes. The metabolite was identified
31 with the time retention (t_R) (min) and the transition of m/z [M - H]⁻. Mass spectral characteristic of
32 phenol metabolites and occurrence in serum from rabbits fed a fraction from HT (O), PCy (G) and mix
33 HT/PCy (M).
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Mével et al. Fig. 1

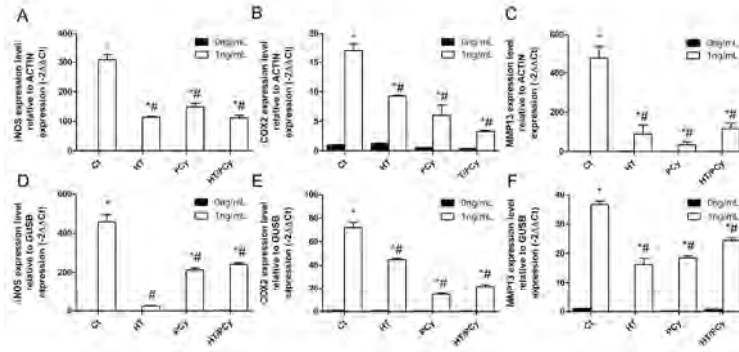


Figure 1: HT, PCy and HT/PCy effects on iNOS, COX2 and MMP13 expression
 RAC and HAC were cultured 24h with HT, PCy or HT/PCy and treated 24h with IL-1β (1ng/mL). The expression of iNOS (A and D), COX2 (B and E) and MMP13 (C and F) were evaluated by real time RT-PCR in RAC (A, B and C) and HAC (D, E and F). # p<0.05 compared to the condition with IL-1β (1 ng/mL) alone, * p <0.05 compared to the condition without IL-1β with the same extract solution.
 297x420mm (300 x 300 DPI)

Mével et al, Fig. 2

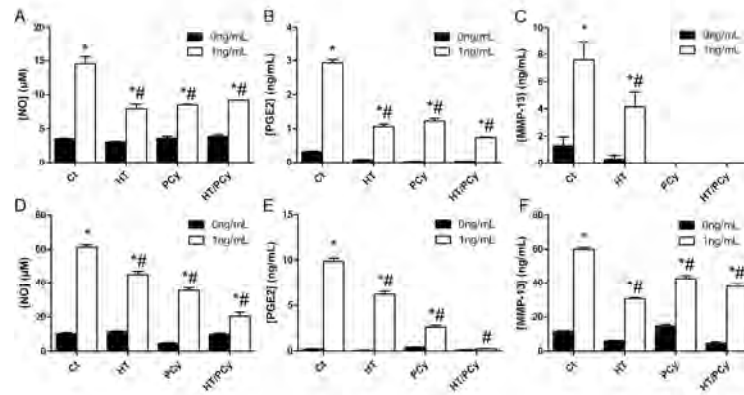


Figure 2: HT, PCy and HT/PCy effects on NO, PGE2 and MMP-13 production
 RAC and HAC were pretreated with HT®, PCy or HT/PCy during 24h prior to IL-1β stimulation (1ng/mL) for 24h. NO production was assessed using Greiss reaction, PGE2 and MMP-13 production were measured using ELISA assay in RAC (A, B and C) and HAC (D, E and F). The MMP-13 productions in RAC treated by PCy and HT/PCy were under the detection range. # p<0.05 compared to the condition with IL-1β (1 ng/mL) alone, * p<0.05 compared to the condition without IL-1β with the same extract solution.
 297x420mm (300 x 300 DPI)

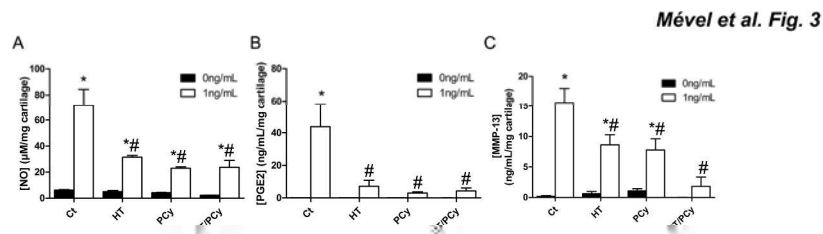


Figure 3: Effect of HT, PCy and HT/PCy on cartilage explants
 Human cartilage explants were preincubated with HT, PCy and HT/PCy for 24h and stimulated with IL-1 β (1ng/mL) for 48h. Effect of HT, PCy and HT/PCy on NO (A) and PGE2 (B) release in culture media was measured. # $p < 0.05$ compared to the condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone, * $p < 0.05$ compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution.
 297x420mm (300 x 300 DPI)

Mével et al. Fig. 4

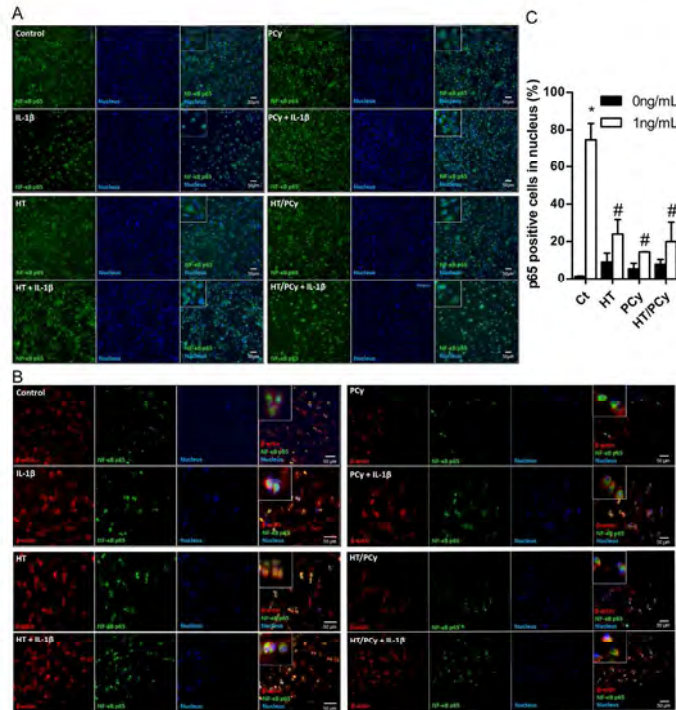


Figure 4: HT, PCy and HT/PCy effects on the IL-1 β -dependent NF-KB p65 translocation in HAC and human cartilage explants
 HAC were pretreated for 24h with HT, PCy and HT/PCy and then IL-1 β (1ng/mL) was added to the medium for an additional 24h. Immunofluorescence assay for p65 subunit (A) was performed, and p65 positive cells in nucleus was counted (B). Immunofluorescence assay for p65 subunit were performed in cartilage explants (C). In a control condition without treatment, a light cytoplasmic immunostaining was seen with anti-p65 antibody. # $p < 0.05$ compared to the condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone, * $p < 0.05$ compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution.
 209x297mm (300 x 300 DPI)

Mével et al. Fig 5

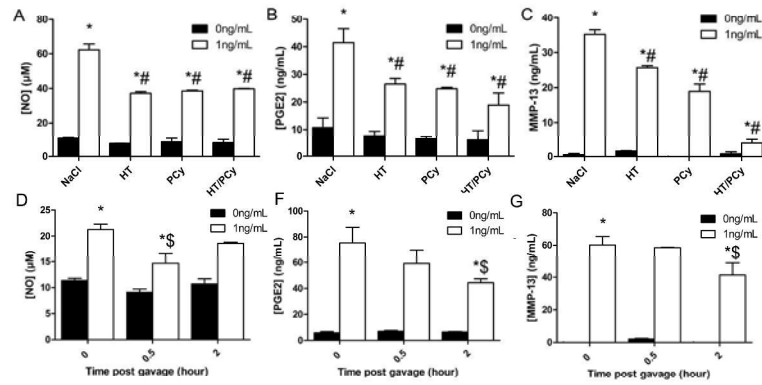


Figure 5: Effects of serum from rabbit and dogs fed with HT and/or PCy on the IL-1 β -induced levels of NO, PGE2 and MMP-13 production

Rabbits (n=3 per condition) were fed with HT, PCy and HT/PCy (100mg/kg) or saline solution (NaCl) every two days during 6 days and serum were harvested 2 h after the last gastric gavage. Dogs (n=3) were fed with HT/PCy (100mg/kg) each days during 7 days and sera was harvested before (0 min), 30 min and 2 h after the last gastric gavage. RAC were cultured during 24h in presence of serum from rabbit (A to C) or dog (D to F) at a final concentration of 2.5% (v/v) and stimulated with IL-1 β (1ng/mL) for an additional 24h.

The NO (A and D) and PGE2 (B and E) and MMP-13 (C and F) released in culture media were measured. # p<0.05 compared to the NaCl condition with IL-1 β (1 ng/mL), * p <0.05 compared to the condition without IL-1 β with the same extract solution, \$ p<0.05 compared to the 0 min condition with IL-1 β (1 ng/mL) alone.

297x420mm (300 x 300 DPI)




Mével et al. Table 1

Compounds	T _R (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Occurrence
<i>HT</i>				
hydroxytyrosol glucuronide	3.0	329	153	O, M
hydroxytyrosol sulphate	3.1	233	153	O, M
homovanillic acid sulphate	3.6	261	181	O, M
tyrosol glucuronide	5.5	313	137	O, M
tyrosol sulphate	5.7	217	137	O, M
<i>PCy</i>				
catechin glucuronide	3.5	465	289	G, M
epicatechin glucuronide	3.8	465	289	G, M
catechin sulfate	4.0	369	289	G, M
methyl catechin glucuronide	4.2	479	303	G, M
epicatechin sulfate	4.4	369	289	G, M
dihydroxyphenylvalerolactone sulphate	4.5	287	207	G, M
methyl catechin sulfate	4.6	383	303	G, M
dihydroxyphenylvaleric acid sulphate	5.1	289	209	G, M
hydroxyphenylpropionic acid	5.2	165	121	G, M

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Mével et al. Suppl. data Table 1

Table 1 Composition

Extract	Nature	1X solution
	Extract of olive titrated in polyphenols	6.5mg HT/100g
	Extract of grape seeds titrated in polyphenols	30mg GSP/100g
	Extract of grape seeds and olive titrated in polyphenols	6.5mg HT/100g 30mg GSP/100g

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review

Mével *et al.* Suppl. data Table 2

Table 2 Primers

Species	Amplified gene	Primer sequences (5'-3')	Gene Bank Reference	Amplicon Size (bp)
Rabbit	INOS	FP: TGACGTCCAGCGCTACAATA RP: TGCGTCTCCAGTCCCATC	AF198443.1	60
	COX2	FP: GGAAGCGCTCTACGGCGACA RP: CCCCAAAGATGGCATCCGGGC	NM_001082388.1	96
	MMP13	FP: TTTTGAAGACACGGGCAAG RP: TCATCATAGCTCCAGACTGGTT	NM_001082037.1	60
	ACTB	FP: CCCATCTACGAGGGCTACGC RP: TCCTTGATGTCCCACCGATC	NM_001101683.1	152
Human	INOS	FP: GCTCAAATCTCGGCAGAATC RP: GCCATCTCACAGGAGATT	NM_000625.4	79
	COX2	FP: CTTACGCATCAGTTTTCAAG RP: TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC	NM_000963.2	96
	MMP13	FP: CCAGTCTCCGAGGAGAAACA RP: AAAAAACAGCTCCGCATCAAC	NM_002427.2	85
	GUSB	FP: CGCCCTGCCTATCTGTATTC RP: TCCCCACAGGAGTGTGTAG	NM_000181.2	91

254x190mm (96 x 96 DPI)

ARTICLE 3

Hydroxytyrosol and procyanidins consumption decreases the severity of post-traumatic osteoarthritis in mice and rabbits preclinical models

Elsa Mével, Christophe Merceron, Claire Vinatier, Martial Masson, Julie Lesoeur, Vincent Hivernaud, Olivier Gauthier, Jérôme Abadie, Geoffroy Nourissat, Xavier Houard, Nelly Urban, Laurent Beck*,

Jérôme Guicheux*

(*equally contributing authors)

En cours de soumission

Article 3: Hydroxytyrosol and procyanidins consumption decreases the severity of post-traumatic osteoarthritis in two preclinical models – en cours de soumission

Résumé:

Après avoir mis en évidence dans l'article 2 l'effet chondroprotecteur de l'hydroxytyrosol et des procyanidines, nous avons ensuite cherché à évaluer ce potentiel dans des modèles d'arthrose induite par chirurgie chez la souris puis le lapin.

Dans une première étude conduite dans un modèle d'arthrose induite chirurgicalement par déstabilisation médiale du ménisque (DMM) bilatérale chez la souris nous avons évalué l'effet préventif de la supplémentation de l'alimentation en hydroxytyrosol et/ou en procyanidines. La glucosamine a été utilisée comme contrôle positif lors des expérimentations. Nous avons également cherché à connaître la sécurité d'utilisation des extraits sur une période prolongée (12 semaines) en contrôlant la prise de poids au cours du temps. Enfin, d'un point de vue moléculaire, le catabolisme des composants de la matrice (aggrecan, collagène de type 2) a été évalué par immunohistochimie (Figure 17).

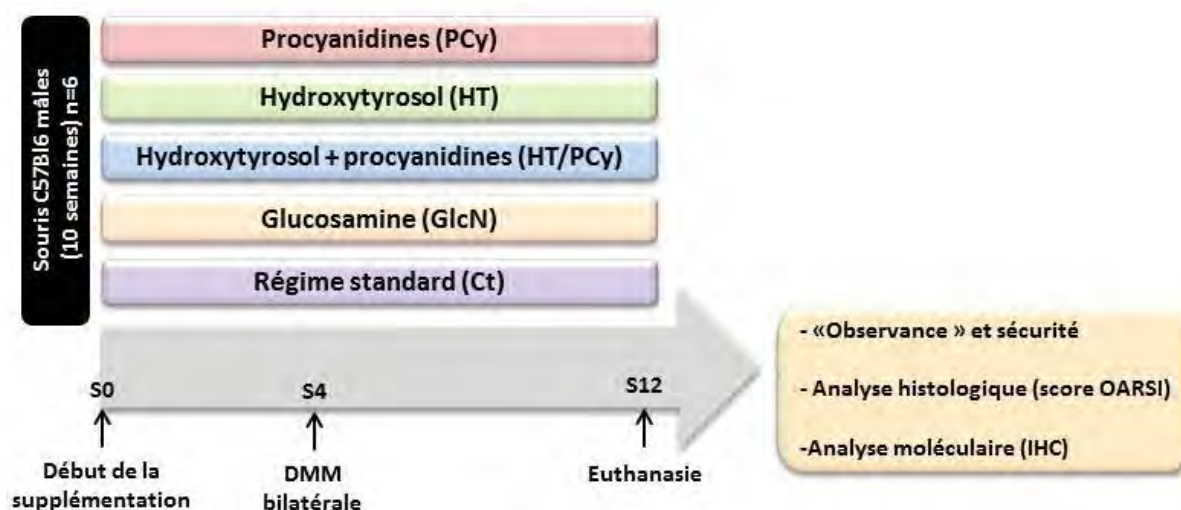


Figure 17 : Schéma expérimental de l'approche *in vivo* chez la souris.

Dans ce modèle murin nous avons mis en évidence une prise de poids homogène quel que soit l'extrait administré ce qui reflète une bonne tolérance du traitement. D'autre part, nous avons pu constater une amélioration de la sévérité des lésions arthrosiques induites par la chirurgie dans les groupes traités avec les extraits. De manière intéressante nous n'avons pas constaté de différence significative entre le groupe ayant reçu une alimentation supplémentée en extraits et le groupe traité

à la glucosamine. Cette expérimentation ainsi que les résultats obtenus dans l'article 2 nous ont permis de sélectionner un traitement parmi ceux qui ont été testés, l'association d'hydroxytyrosol et de procyanidines, pour la suite des expérimentations.

Cette étude préclinique s'est poursuivie par une expérimentation dans un modèle d'arthrose post-traumatique induite par la section du ligament croisé antérieur (« *anterior cruciate ligament transection* » (ACLT)) chez le lapin. Dans ce modèle nous avons évalué l'effet préventif de supplémentation de l'alimentation avec le mélange d'hydroxytyrosol et de procyanidines en comparaison avec la glucosamine (contrôle positif) et le placebo qui reçoit uniquement le véhicule (sérum physiologique, NaCl). L'effet préventif du traitement a été évalué par un score radiographique, une analyse du gonflement de l'articulation (*i.e.* qui reflète une inflammation sous-jacente), un score histologique ainsi qu'une analyse immuno-morphologique de la matrice (Coll2, ACAN, NITEGE). Ce modèle de lapin que nous avons précédemment utilisé dans l'article 2 afin d'évaluer la biodisponibilité plasmatique des extraits et leur bioactivité avec ingestion possède, l'avantage d'un contrôle strict de la dose d'extrait administrée (Figure 18).

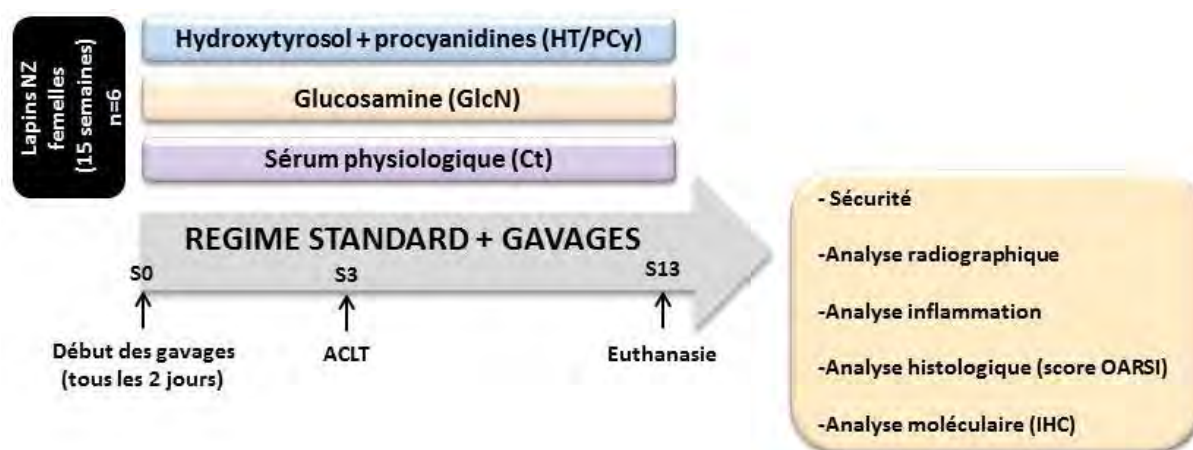


Figure 18 : Schéma expérimental de l'approche *in vivo* chez le lapin. IHC : immunohistochimie

Cette partie du travail a confirmé la capacité de l'association d'hydroxytyrosol et de procyanidines à préserver la santé articulaire dans un second modèle préclinique d'arthrose. Dans ce modèle, la consommation de l'extrait pendant 13 semaines a bien été tolérée. De plus, les scores radiologique et histologique sont diminués chez les lapins traités avec l'extrait en comparaison avec le contrôle. Cette étude a également permis de confirmer notre hypothèse de travail selon laquelle l'hydroxytyrosol et les procyanidines permettent de prévenir la dégradation des protéines matricielles du cartilage articulaire par une capacité anti-inflammatoire et en inhibant l'activité des protéases. De manière intéressante, nous avons noté dans ce modèle que l'extrait hydroxytyrosol/procyanidines était significativement plus efficace dans la prévention de l'arthrose

que la glucosamine, le control positif. L'ensemble de ces données indiquent que la combinaison d'hydroxytyrosol et de procyanidines est un candidat prometteur dans la prise en charge préventive de l'arthrose.

1 Procyanidins and hydroxytyrosol consumption decreases the severity of post-traumatic
2 osteoarthritis in mice and rabbits preclinical models

3
4 Elsa Mével^{1,2,3}, Christophe Merceron^{1,3}, Claire Vinatier^{1,3}, Julie Lesoeur^{1,3}, Vincent Hivernaud^{1,3},
5 Olivier Gauthier^{1,3,4}, Jérôme Abadie⁵, Geoffroy Nourissat⁶, Xavier Houard⁶, Nelly Urban², Laurent
6 Beck^{1,3*}, Jérôme Guicheux^{1,3,7*}

7
8 ¹INSERM, UMRS 791, “Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology” group LIOAD, Nantes,
9 France.

10 ²Union Grap’Sud, Cruviers-Lascours, France.

11 ³Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, France.

12 ⁴Center for Preclinical Research and Investigation of the ONIRIS Nantes-Atlantic College of
13 Veterinary Medicine, Food Science and Engineering (CRIP), Nantes, France

14 ⁵Cancers animaux, Modèle pour la recherche en Oncologie Comparée (AMaROC), Nantes, France

15 ⁶INSERM, UMRS 938, Metabolism and age-related joint diseases, Université Paris 6 Pierre & Marie
16 Curie, Paris, France

17 ⁷CHU Nantes, Pôle Hospitalo-Universitaire 4 OTONN, Nantes, France.

18 *These authors contributed equally to this article

19
20 Corresponding author:

21 Jérôme Guicheux

22 INSERM U791

23 School of Dental Surgery

24 1 Place Alexis Ricordeau

25 44042 Nantes cedex 1

26 France

27 Phone: +33-(0)2-40412919; Fax: +33-(0)2-40083712

28 Email: jerome.guicheux@inserm.fr

29

30 Introduction

31 Osteoarthritis (OA) is a common inflammatory joint disease that affects a growing part of elderly [1]
32 and is associated with strong socio-economic impact [2]. OA affects mainly weight-bearing joints such
33 as knee or hip. Subchondral bone allows impacts damping enforced during the movement. Instability
34 of joint, for example ligament injury, dramatically increases the risk of OA [3]. On a clinical point of
35 view, OA is characterized by a progressive cartilage loss, subchondral bone remodeling, osteophytes
36 formation, and inflammation affecting all joint tissues [3, 4]. Articular cartilage degradation is one of
37 the major concerns in OA, which is attributed to aggrecans and collagens cleavage. The order in which
38 the cartilage extracellular matrix (ECM) components are degraded remains unclear. However, few
39 studies conducted on cartilage explants suggested that aggrecans cleavage occurs before collagen
40 degradation [5-7]. The early degradation of aggrecan occurring in OA suggests that its breakdown is
41 an important outcome to monitor. This breakdown of ECM proteins is regulated by specific proteases
42 like metalloproteinase (MMPs) and aggrecanases which release fragments from the tissue [8-10] and
43 protein products still complexed to the ECM (*e.g* NITEGE, VIPEN, DIPEN) [11, 12]. These
44 fragments offer promising and interesting biomarkers to follow the onset of OA in humans and
45 animals.

46 The optimal treatment for OA would be a therapy that can concomitantly block the progressive
47 degradation of articular cartilage and improve symptomatic relief such as inflammation and pain.
48 However, to date there is no curative treatment for OA. Available pharmaceutical drugs alleviate
49 inflammation and pain but none succeed to slow down, stop or reverse the progression of the cartilage
50 degradation and other adverse tissular injuries related to the pathology [13].

51 Hydroxytyrosol (HT) and Procyanidins (PCy), two bioactives polyphenols found in olive and grape
52 seed, exert numerous health promoting effects on inflammation, aging, and cancer. Of note, we have
53 previously demonstrated that HT and/or PCy extracts exert potent *in vitro* chondroprotective effects.
54 In fact, HT and/or PCy reduced the IL-1- β -induced levels of inflammatory and catabolic markers

55 including nitric oxide (NO), prostaglandin-E₂ (PGE₂) and MMP-13 in *in vitro* isolated chondrocytes
56 and in *ex vivo* cartilage explants (Mével et al., submitted). Interestingly, we also showed that HT
57 and/or PCy extracts are bioavailable in rabbit sera after oral consumption and maintain their anti-
58 inflammatory activities. Whereas their powerful *in vitro* anti-IL-1 β properties make HT and PCy
59 promising candidates for the treatment of OA, their *in vivo* anti-OA effects remains to be
60 demonstrated.

61 In the present study, we wanted to extend these observations by evaluating whether HT and/or PCy
62 extracts could exert a protective effect on OA progression in adapted animal models. To investigate
63 these preventive effects of extracts on OA, two post-traumatic complementary OA models in mouse
64 and rabbit were used. OA mouse model induced by destabilization of medial meniscus (DMM) was
65 first used. In this model the diet was supplemented with HT and PCy extracts alone or in association.
66 High doses were tested in order to screen the safety and efficacy of different treatments on OA
67 severity. Glucosamine (GlcN) which is well known to improve OA-related symptom in *in vitro* and *in*
68 *vivo* models including human clinical trials, was used as a positive control for all experiments [14-17].
69 The most promising treatment in mice experiment was selected and its protective effect was then
70 further investigated in anterior cruciate ligament transection (ACLT)-induced OA in rabbits. In this
71 rabbit model, we evaluated the safety and the preventive effects of the combination of HT and PCy
72 extracts compared to GlcN. The effects of HT/PCy extracts on severity of OA lesions including
73 cartilage loss, subchondral bone changes, inflammation and ECM components cleavage were
74 evaluated.

75 Materials and methods

76 Food supplementation with extracts

77 The Olivex[®], an olive extract (referred as to HT extract), Exgrape[®]SEED, a grape seed extract
78 (referred as to PCy) and Oleogrape[®]SEED, an extract from olive and grape seed (referred as to
79 HT/PCy) dry powders were provided by Grap'Sud Union (Cruviers Lascours, France). D-(+)-GlcN
80 hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis-MO, USA). Standard powder diet

81 RM1 was obtained from Special Diet Services (Essex, UK). Diets for mice experiments were prepared
82 by the experimental food preparation unit (Jouys-En-Josas, France) by complementing the diet with
83 HT, PCy HT/PCy or GlcN in RM1 standard diet. Mice received high doses of extracts as a screening
84 base to observe an effect. Gavage solutions for rabbit's experimentation were prepared
85 extemporaneously by dissolving the extracts in saline solution NaCl 0.9% (Sigma-Aldrich). Compared
86 to mice, rabbits received approximately 40-fold lower doses of extracts, closer to clinically relevant
87 range which allows observing difference between different treatments. Moreover, an allometric scaling
88 factor was applied based on metabolic body size to predict and compare extract effects among mice
89 and rabbits species [18-20].

90 Ethical consideration in animal models

91 All animal procedures were approved by the institution's animal welfare committee (CEEA
92 Pays de la Loire) and were conducted in accordance with the European's guidelines for the care and
93 use of laboratory animals (2010/63/UE). Mice were housed in the animal facility of Faculty of
94 Medicine (Agreement n°C44015) and rabbits were hosted in Centre for Research and Preclinical
95 Investigation (ONIRIS Agreement n° E44271). Animals were maintained in a controlled environment
96 subjected to a 12 h light/dark cycle with free access to both food and water.

97 Mice experimental design

98 The study was performed on 30 C57/BL6 10 week-old mice, which have reached full skeletal
99 maturity. After an acclimatization period of one week, the mice were randomly assigned into 5 groups
100 (n=6 per group). The control group received a standard diet and the other groups received either a
101 standard diet enriched with 2.56% of GlcN, or with 2.37% of olive extract, or with 1.94% of grape
102 seed extract, or with 2.70% of olive and grape seed. Extracts supplementations rate were calculated
103 considering that mice consumed 4g per day, which correspond at 7,7mg of HT and of 35mg of PCy
104 per day. This allows to supplement mice diets with a standardized and consistent amount of active
105 compounds contained in the extracts. In order to access the safety of extracts, animals were weighed
106 every two days. OA was experimentally induced by bilateral DMM 4 weeks after the start of diets

107 supplementation. The animals were euthanized 8 weeks following surgery by cervical dislocation and
108 all joints were dissected for further histological examinations. One mouse in the control group was
109 excluded from the analysis because the histological analysis revealed that the ligaments had not been
110 sectioned.

111 Rabbit experimental design

112 Eighteen 15 week-old female New Zealand white rabbits were purchased from Hypharm-Grimaud
113 (Roussay, France). At 15 week-old, rabbits have reached full skeletal maturity and gender has no
114 influence on the development of the disease [21]. After one week of acclimatization, rabbits were
115 randomly divided into 3 groups (n=6 per group). Experimental groups received GlcN (100mg/kg) or
116 HT/PCy (100mg/kg) in 1mL of saline solution (NaCl 0.9%). Extracts were administrated every two
117 days by stomacal gavages for 13 weeks. A third group received saline solution NaCl 0.9% (control
118 group) (1mL/kg). Three week following the start of gavage, rabbits underwent a destabilization of the
119 right joint induced by ACLT. Ten weeks following surgery, rabbits were euthanized by an overdose of
120 barbiturates.

121 Histological staining and immunohistochemistry

122 After euthanasia, knee samples from each animal were fixed in 4% paraformaldehyde followed by
123 decalcification by EDTA 0.5M (pH 7.4) solution for mice samples and by DC3 solution (VWR,
124 Radnor, PA, USA) for rabbit's knees. Dehydration was performed subsequently, and specimens were
125 embedded in paraffin, and cut into section of 5 μ m thickness using rotary microtome. Safranin O fast
126 green and hemotoxylin-erythrosine-safran (HES) stainings have been performed to identify cartilage
127 cells and matrices. Immunohistochemistry was performed on deparaffinized and rehydrated sections
128 with specific primary antibodies: type II collagen antibody (anti-mouse: 1:400, ab34712, Abcam and
129 anti-rabbit: 1:100, 08631711, MP biomedical), aggrecan antibody (anti-mouse: 1:100, ab1031, Merck
130 Millipore and anti-rabbit: 1:100, MA3-16888, Thermo Scientific) and NITEGE antibody (anti-mouse:
131 1:50, PA1-1746, Thermo Scientific and anti-rabbit: 1:50, MBS442004, My Biosource) for the
132 detection of aggrecan cleavage. All sections were counterstained using Mayer's hematoxylin (RAL

133 Diagnostic, Martillac, France). Tissue staining was viewed using Nanozoomer 2.0 Hamamatsu slide
134 scanner (Hamamatsu City, Japan).

135 OA severity by evaluation of OARSI scoring

136 The severity of OA in all samples was assessed and compared according to the Osteoarthritis Research
137 Society International (OARSI) scoring. The OARSI scoring system was adapted and used for
138 histologic assessment in a blind manner. The severity of OA lesions was scored on a scale of 0 to 6
139 using parameters such as chondrocytes death, hypertrophy, clusters, loss of Safranin-O staining,
140 surface alteration, and bone modifications. The scoring system used is presented in Table 1. Scoring
141 was performed on serial sections (2-4); at least two joint regions have been analyzed.

142 OA severity assessed by radiographic imaging and OARSI score

143 Radiographic pictures of the rabbit's hind limbs (antero-posterior and lateral views) were taken using a
144 Convix 300 system (Picker International Inc, Cleveland, OH, USA). Pictures were taken following
145 euthanasia to evaluate structural damages in the joints. Knee OA severity was quantitatively assessed
146 using a homemade radiographic score inspired by Kellgren & Lawrence [22] and Boulocher et al.
147 [23]. The scoring was performed by 2 independents blind readers. The severity of OA lesions was
148 scored using multiple parameters such as calcification of menisci, tendons and ligaments, number and
149 localization of osteophytes, bone modifications, and joint space narrowing. The scoring system used is
150 summarized in Table 2.

151 Statistical analysis

152 Results are expressed as mean \pm SEM. Comparative studies were analyzed using an ANOVA test
153 followed by post-hoc Fisher test with P values less than 0.05 considered as statistically significant.

154

155 Results

156 Effect of diet supplementation with HT and/or PCy on body weight and OA severity in DMM
157 mice

158 In order to assess the safety of diet supplementation with high doses of HT and/or PCy, mice's weights
159 were controlled during 12 weeks. The initial and final body weight did not differ among the different
160 experimental groups (Table 3). The mice gained about 5.7 ± 0.4 g during the 12 weeks of diet
161 supplementation. The daily dose consumed during all the experiments was in average 3.97 ± 0.4 g per
162 mouse per day. To examine the effects of phenolic compounds intake on cartilage and bone alteration
163 induced by DMM, glycosaminoglycan component of cartilage was stained with safranin-O (Figure
164 1A). As expected, the histopathological examination of safranin-O stained sections revealed that
165 sections in the control group (Ct) that received standard diet, showed signs of severe OA which result
166 in cartilage matrix fissures. In some cases, cartilage delamination or excavation were reaching
167 subchondral bone (black arrow). In all treated groups superficial zone was intact or presented only
168 barely detectable superficial abrasion that can exhibit safranin-O depletion. Moreover, some
169 chondrocytes in treated groups were hypertrophic or were organized in clusters, signs of early stage
170 OA. In order to evaluate the severity of OA among different experimental groups, OARSI scores were
171 assessed (Figure 1B). Interestingly, the degeneration of articular cartilage was attenuated by HT and/or
172 PCy-supplemented mice, as reflected by significantly reduced proteoglycan loss and cartilage erosion
173 in OARSI score. Of note, GlcN treated mice exhibited an OARSI score similar to that of HT and/or
174 PCy treated mice.

175 Effect of diet supplementation with HT and/or PCy on ECM catabolism in DMM mice

176 As OA alter ECM components of articular cartilage, we questioned whether HT and/or PCy
177 could protect matrix degradation following DMM in mice. The presences of type 2 collagen (Coll2),
178 aggrecan (ACAN) and NITEGE revealing the aggrecan cleavage by specific proteases were thus
179 evaluated. Figure 2 shows that Coll2 expression is not affected among the different experimental
180 groups. In mouse knee joints subjected to experimental OA, ACAN staining levels were decreased
181 compared to treated groups with GlcN, HT and/or PCy. Furthermore, the effects of surgery on ACAN
182 cleavage were confirmed by intense NITEGE expression in lower zone and particularly in the
183 pericellular region of Ct group. In contrast, the NITEGE staining was decreased when mice received a

184 diet supplemented with GlcN, HT and/or PCy. No significant difference was found between the
185 extracts alone or in combination.

186 Effects of treatment with HT/PCy on rabbit's body weight

187 In order to assess the safety of HT/PCy or GlcN (100mg/kg) during the investigation period in rabbit's
188 model, animal's weights were monitored every two days. The initial and final body weights of the
189 rabbits did not differ among the different experimental groups (Table 4). Rabbits gained an average of
190 878 ± 0.12 g during the 13 weeks of experimentation.

191 Effect of treatments on the radiographic score by X-ray evaluation in ACLT rabbits

192 In order to confirm the obtained results in mice on the preventive effect of HT/PCy, a surgically
193 induced-OA model of rabbit was used. X-ray of rabbit's knees showed that HT/PCy treatment
194 decreased the ligament calcification, osteophytes incidence (illustrated by white stars), bone sclerosis
195 and width of joint space narrowing associated with a significant decrease in the radiographic score
196 compared to ACLT control group (no treatment). The data demonstrated that HT/PCy exerts similar
197 effects on OA-induced rabbit model than GlcN (Figure 3).

198 Effect of treatment with HT/PCy on joint swelling in ACLT rabbits

199 Our lab previously shows that HT/PCy treatment reduces OA-related inflammation symptoms *in vitro*
200 and using *ex vivo* models (Mével et al., submitted). In a clinical point of view, OA inflammation
201 typically results in joint swelling [4]. Figure 4 did not reveal a significant difference of non-operated
202 knees (lateral control) among different experimental groups. At 10 weeks following surgery, vehicle-
203 treated ACLT rabbits exhibited a marked joint swelling compared to non-operated joint. Interestingly,
204 in HT/PCy treated group, no significant difference between ACLT joint and the lateral control was
205 observed. GlcN treatment didn't significantly improve joint swelling induced by ACLT (Figure 4D).

206 Effect of treatment with HT/PCy on OA severity in ACLT rabbits through OARSI score

207 After demonstrating that the extracts markedly improve the radiographic score and joint swelling, we
208 questioned whether HT/PCy intake may also impact subchondral bone changes at the onset of OA.

209 Since, our decalcification method (DC3 solution, VWR) was incompatible with safranin-O fast green
210 method, we established OARSI score on HES staining and type 2 collagen immunostaining. Then, the
211 loss of safranin-O parameter was not evaluated in this experiment and the OARSI score was adapted.
212 Figure 5A shows that the articular cartilage surface was smooth and that chondrocytes were well
213 organized in control lateral knees. When rabbits from the control group (Ct) underwent ACLT,
214 cartilage erosion from the surface up to the deep area was observed. In experimental ACLT group
215 treated with GlcN, the erosion was extended from the surface to the mid zone. Interestingly, ACLT
216 rabbits treated with HT/PCy did not shown cartilage erosion, but presented cartilage swelling
217 (œdema). Consistently with mice results, HT/PCy significantly decreased OARSI score severity.
218 Surprisingly, GlcN was not found to exhibit a detectable effect on OA (Fig. 5B).

219 Effect of HT/PCy treatment on ECM of articular cartilage catabolism

220 After gross observation, we sought to demonstrate the effects of HT/PCy intake on articular cartilage
221 matrix breakdown. Figure 6 shows that surgery did not affect type 2 collagen immunostaining in all
222 groups despite degradation of articular cartilage was observed in Ct (Fig. 6B) and GlcN (Fig 6.D)
223 groups. On the contrary and as expected, surgery led to a substantial loss of ACAN staining in
224 comparison with un-operated knee (Fig. 6). In this group after ACLT, staining was more intense
225 around clusters of chondrocytes. Cartilage from rabbits treated with GlcN or HT/PCy revealed a
226 moderate loss of ACAN staining. NITEGE immunostaining was used to assess aggrecan degradation.
227 Interestingly, immunostaining reveals that surgery increased NITEGE staining, throughout the matrix
228 and particularly in pericellular region reflecting cleavage by specific protease. In contrast, when
229 rabbits where fed with GlcN intense NITEGE staining is maintained around clusters whereas in
230 HT/PCy group staining is markedly reduced.

231 Discussion

232 Despite OA one of the most common invalidating disease, curative treatment is still lacking [3, 13]. In
233 the field of novel preventive strategies, *in vivo* models are extensively used to mimic human OA
234 symptoms. Among these models, surgical-induced ones are used preferentially to induce an OA

235 phenotype that more closely resembles to the human post-traumatic situation and might be especially
236 relevant for investigating the preventive potential of specific compounds [24, 25]. In this context, we
237 first used a model of mid-stage OA induced by DMM in mice. Thus, the effects of HT and PCy alone
238 or in association were tested at high doses as a screening base to observe an effect in this model. As
239 expected and as previously reported, PCy prevents cartilage degradation in this mouse surgical
240 osteoarthritis model [26]. Of particular interest, and for the first time, our data also indicate that HT
241 alone or in association with PCy decreased OA severity. Taken together, these data suggested that HT
242 and/or PCy could prevent post-traumatic OA.

243 We also aimed to evaluate potential synergetic effect using the association of HT and PCy.
244 Surprisingly, our in the DMM-induced murine OA model data indicate that a combination of HT and
245 PCy didn't exhibit more drastically effect as compared to HT or PCy alone. It may be hypothesized
246 that HT and PCy, with their close chemical structure, may exert their protective effect through the
247 same mechanism. This could explain why our experiment did not reveal synergistic effect using the
248 combination of HT/PCy. Nevertheless, based on previous *in vitro* experimentation where the
249 association of HT and PCy was shown to present more potent anti-inflammatory activity than extracts
250 alone (Mével et al., submitted), we decided to investigated the combination of HT/PCy in the rabbit
251 model.

252 Following this first set of results generated in a murine model of OA and to strengthen the scientific
253 relevance of our work, we were then interested in testing whether this association of extracts could
254 also have preventing properties in a larger animal model. We thus embarked on experiments using a
255 rabbit OA model induced by ACLT. In addition of being a model closely related to the human clinical
256 situation, rabbit's model allows us to conduct further analysis such as joint space narrowing than in a
257 small mammal like a mouse model. Rabbits received approximatively 40-fold lower doses of extracts,
258 closer to clinically relevant range. In this model, we demonstrated that HT/PCy significantly improve
259 radiographic and histologic OA by decreasing articular cartilage degradation. We previously show that
260 HT/PCy significantly reduced the IL1- β -induced levels of inflammatory biomarkers (*e.g* NO, PGE₂) in

261 rabbit articular chondrocytes. Consistently, our data in rabbit OA model indicate that HT/PCy totally
262 blunt the joint swelling induced by ACLT, a clinical sign associated with joint inflammation.

263 Recently, data from clinical studies suggested that GlcN reduced pain and improve joint junction [17].
264 Moreover, results from studies conducted in rabbit OA model induced by ACLT alone or in
265 association with meniscectomy demonstrate that daily oral treatment with GlcN or GlcN in
266 combination with chondroitin sulfate decreases OA severity (Mankin score) and alleviates cartilage
267 degradation [16, 27]. In the light of these data, GlcN was used as a positive control in our experiments.
268 Surprisingly, our study shows that GlcN treatment ameliorated radiographic OA score but did not
269 improve joint swelling or OARSI score. According to a meta-analysis, it can be hypothesized that
270 symptomatic effects of GlcN vary widely depending on the formulation used [17]. Interestingly, we
271 demonstrated that HT/PCy reduce more drastically the joint swelling and cartilage degradation
272 induced by ACLT in rabbits than GlcN. These data strongly suggest that a combination of HT and
273 PCy may be more prone to inhibit OA-related inflammation process as compared to GlcN. In addition,
274 we also report that HT/PCy inhibited the production of NITEGE induced by surgery. This indicate that
275 HT/PCy protect from cartilage catabolism. Consistent with our previous study, HT/PCy could exert a
276 protective effect against metalloproteinase catabolic activities *in vivo* as it has been demonstrated *in*
277 *vitro* in rabbit articular chondrocytes (Mével et al., submitted).

278 Finally a large panel of side effects has been reported for GlcN including sensitivity and/or epigastric
279 pain, heartburn, diarrhea, nausea and allergic reactions. In addition, GlcN is well acknowledged to
280 interact with various drugs, such as warfarin (Coumadin) and anti-diabetic drugs, thereby dangerously
281 altering their effectiveness [28]. Considered together the side effects and limitations of GlcN, it seems
282 reasonable to assume that HT/PCy can be a potential interventional treatment that deserves to be
283 considered in OA.

284 To conclude, in this study we provide *in vivo* evidence in two complementary animal models of post-
285 traumatic OA that HT and PCy alone or in combination exert protective effects on OA progression.
286 Although GlcN was found to exhibit a marked and significant effect on cartilage erosion by decreasing

287 OARSI score in mice model and by reducing radiographic score in rabbit OA-induced model, this
288 treatment fail to improve joint swelling and OARSI score in rabbits after ACLT. Taken together, our
289 results suggest that HT/PCy extracts may be of clinical significance for the treatment of OA.

290 **Acknowledgements-** The authors are grateful to B. Fellah, I. Leborgne, and P. Roy (CRIP- ONIRIS)
291 who contributed to experiments using rabbits; S. Sourice (Inserm UMRS 791) for her advice with
292 histological analysis; E. Hay (Inserm UMRS 1132) for his advice with NITEGE IHC; F. Berenbaum
293 for his help in DMM mice model; UTE Platform (SFR François Bonamy, FED 4203/ Inserm UMS
294 016/CNRS 3556) who provided daily care to mice.

295 **Role of the funding source-** This study was supported by Grap'Sud, Région Languedoc Roussillon,
296 the BPI and the ANRT.

297 **Competing interests-** The authors have declared no conflict of interest. NU is an employee of
298 Grap'Sud.

- 300 1. Nuesch, E., et al., *All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip*
301 *osteoarthritis: population based cohort study*. *Bmj*, 2011. **342**: p. d1165.
- 302 2. Leardini, G., et al., *Direct and indirect costs of osteoarthritis of the knee*. *Clin Exp Rheumatol*,
303 2004. **22**(6): p. 699-706.
- 304 3. Bijlsma, J.W., F. Berenbaum, and F.P. Lafeber, *Osteoarthritis: an update with relevance for*
305 *clinical practice*. *Lancet*, 2011. **377**(9783): p. 2115-26.
- 306 4. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. *Arthritis Rheum*, 2012.
307 **64**(6): p. 1697-707.
- 308 5. Pratta, M.A., et al., *Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage*. *J Biol*
309 *Chem*, 2003. **278**(46): p. 45539-45.
- 310 6. Karsdal, M.A., et al., *Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase*
311 *but not matrix metalloproteinase activity*. *Arthritis Res Ther*, 2008. **10**(3): p. R63.
- 312 7. Lim, N.H., et al., *Reactive-site mutants of N-TIMP-3 that selectively inhibit ADAMTS-4 and*
313 *ADAMTS-5: biological and structural implications*. *Biochem J*, 2010. **431**(1): p. 113-22.
- 314 8. Deberg, M., et al., *New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying*
315 *oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and*
316 *rheumatoid arthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(3): p. 258-65.
- 317 9. Christgau, S., et al., *Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage*
318 *degradation*. *Bone*, 2001. **29**(3): p. 209-15.
- 319 10. Huebner, J.L., et al., *Collagen fibril disruption occurs early in primary guinea pig knee*
320 *osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. **18**(3): p. 397-405.
- 321 11. Knudson, C.B. and W. Knudson, *Cartilage proteoglycans*. *Semin Cell Dev Biol*, 2001. **12**(2): p.
322 69-78.
- 323 12. Little, C.B., et al., *Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic*
324 *cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development*. *Arthritis*
325 *Rheum*, 2009. **60**(12): p. 3723-33.
- 326 13. Clouet, J., et al., *From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage*.
327 *Drug Discov Today*, 2009. **14**(19-20): p. 913-25.
- 328 14. Largo, R., et al., *Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human*
329 *osteoarthritic chondrocytes*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(4): p. 290-8.
- 330 15. Chan, P.S., et al., *Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis*
331 *of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants*. *Osteoarthritis Cartilage*,
332 2005. **13**(5): p. 387-94.
- 333 16. Lippiello, L., et al., *In vivo chondroprotection and metabolic synergy of glucosamine and*
334 *chondroitin sulfate*. *Clin Orthop Relat Res*, 2000(381): p. 229-40.
- 335 17. Towheed, T.E., et al., *Glucosamine therapy for treating osteoarthritis*. *Cochrane Database*
336 *Syst Rev*, 2005(2): p. CD002946.
- 337 18. Rucker, R.B., *Allometric scaling, metabolic body size and interspecies comparisons of basal*
338 *nutritional requirements*. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2007. **91**(3-4): p. 148-56.
- 339 19. Rucker, R. and D. Storms, *Interspecies comparisons of micronutrient requirements: metabolic*
340 *vs. absolute body size*. *J Nutr*, 2002. **132**(10): p. 2999-3000.
- 341 20. Agutter, P.S. and J.A. Tuszynski, *Analytic theories of allometric scaling*. *J Exp Biol*, 2011.
342 **214**(Pt 7): p. 1055-62.
- 343 21. Laverty, S., et al., *The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological*
344 *assessments of osteoarthritis in the rabbit*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. **18 Suppl 3**: p. S53-
345 65.
- 346 22. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthrosis*. *Ann Rheum Dis*,
347 1957. **16**(4): p. 494-502.
- 348 23. Boulocher, C.B., et al., *Radiographic assessment of the femorotibial joint of the CCLT rabbit*
349 *experimental model of osteoarthritis*. *BMC Med Imaging*, 2010. **10**: p. 3.

- 350 24. Bendele, A.M., *Animal models of osteoarthritis*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001.
351 **1**(4): p. 363-76.
- 352 25. Mével, E., et al., *Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools*. Drug
353 Discov Today, 2014. **19**(10): p. 1649-1658.
- 354 26. Aini, H., et al., *Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic
355 cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model*. PLoS One, 2012. **7**(5): p.
356 e37728.
- 357 27. Tiraloché, G., et al., *Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of
358 osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1118-28.
- 359 28. Christiansen, B.A., et al., *Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean
360 Unsaponifiables*. Cartilage, 2015. **6**(1): p. 30-44.
361
362

363 Tables and figures legends

364 Table 1: The OARSI scoring system used to evaluate OA severity.

365

366 Table 2: The radiographic scoring system used to evaluate OA severity.

367

368 Table 3: HT and/or PCy **intake didn't affect** body weight in mice.

369

370 Figure 1: HT and/or PCy diet slows down the progression of mid-stage OA in DMM mice. Mice
371 (n=6 per group) underwent DMM of the right knee. Mice received supplemented diet GlcN, HT and/or
372 PCy for 12 weeks starting 4 weeks before surgery. Safranin O staining (red) (A) and OARSI score (B)
373 of standard diet (Ct), GlcN, HT, PCy and HT/PCy diet groups at 8 weeks following DMM.
374 Arrowheads indicate the area of cartilage erosion. *p<0.05 compared to Ct. Original magnification
375 x10.

376

377 Figure 2: HT and/or PCy intake slows ECM degradation in DMM mice. Mice (n=6 per group)
378 underwent DMM of the right knee. Mice received supplemented diet GlcN, HT and/or PCy for 12
379 weeks starting 4 weeks before DMM. Immunohistochemical staining (brown areas) using antibodies
380 against type 2 collagen (coll 2), aggrecan (ACAN) and NITEGE in DMM mice receiving diet
381 supplementation with GlcN, HT and/or PCy. Arrowheads indicate NITEGE staining in Ct group
382 following DMM. Original magnification x40.

383

384 Table 4: **HT/PCy intake didn't affect body weight in rabbits.**

385

386 Figure 3: HT/PCy decreased radiographic OA score on ACLT rabbit model. Rabbits (n=6 per
387 group) underwent ACLT of the right knee. NaCl (Ct), GlcN or HT/PCy were administrated every two
388 days for 13 weeks starting 3 weeks before surgery, X-ray (A) and radiographic score (B) of lateral
389 control or ACLT untreated rabbits or treated with GlcN or HT/PCy at 10 weeks following surgery.

390 *p>0.05 compared to lateral control within the same group; #p>0.05 compared to ACLT receiving
391 NaCl (Ct) group. White filled stars show osteophytes formation following ACLT.

392

393 Figure 4: HT/PCy treatment protects from joint swelling in ACLT rabbits. Knees width
394 measurement of rabbits at 10 weeks following ACLT (n=6 per group) after NaCl (Ct), GlcN or
395 HT/PCy administration every two days for 13 weeks. Left knees on the photos from each group
396 represent lateral control and the right knees underwent ACLT. Horizontal lines represent the locations
397 where measurements were made *p< 0.05 compared to lateral control of same experimental group.

398

399 Figure 5: HT/PCy treatment slows the progression of mid-stage OA in ACLT rabbits. HES
400 staining (A) and OARSI score (B) of joints from rabbits (n=6 per group) 10 weeks following ACLT of
401 the right knee that received NaCl (Ct), GlcN, HT/PCy treatment every two days for 13 weeks. Arrows
402 indicate the area of cartilage erosion following ACLT. *p>0.05 compared to lateral control within the
403 same group; #p>0.05 compared to ACLT receiving NaCl (Ct) group. Original magnification x2.5.

404

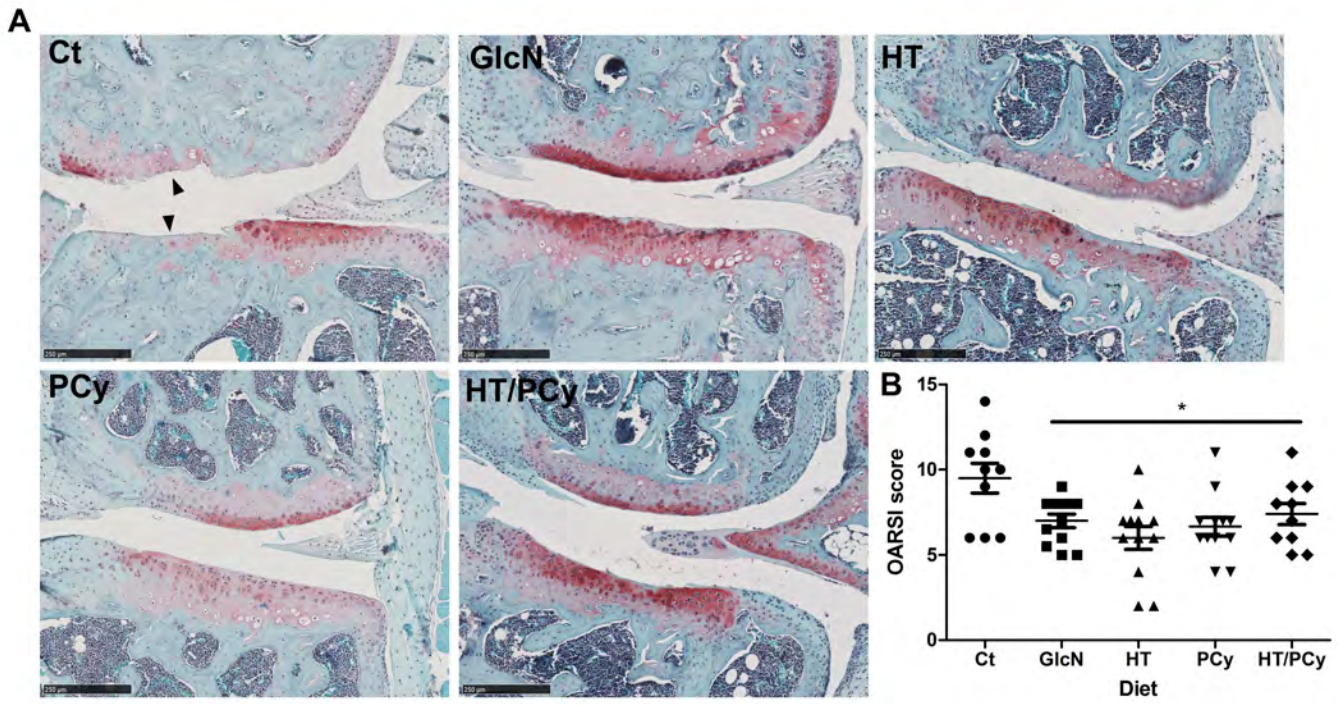
405 Figure 6: HT/PCy treatment slows ECM degradation. Immunohistochemical staining (brown
406 areas) using antibodies against type 2 collagen (coll 2), aggrecan (ACAN) and NITEGE which detects
407 the degraded aggrecan product in ACLT rabbits (n=6 per group) 10 weeks following surgery treatment
408 every two days for 13 weeks with NaCl, GlcN or HT/PCy. Original magnification x10.

409

Chondrocytes death	None	0
	≤ 10%	1
	≤ 25%	2
	≤ 50%	3
	≤ 75%	4
	≤ 100%	5
Hypertrophy	None	0
	Presence	1
Clusters	None	0
	Superficial zone	1
	Middle zone	2
	Complex structures	3
	Mild layer cyst formation	4
Loss of Safranin-O staining	None	0
	Superficial zone of non-calcified cartilage	1
	Middle zone of non-calcified cartilage	2
	Non-calcified cartilage and intense staining around clusters	3
	Absent with staining around clusters	4
	Absent	5
Surface	Intact	0
	Superficial fibrillation or abrasion	1
	Deep fibrillation	2
	Vertical fissures	3
	Delamination/ excavation	4
Bone	None	0
	Denudation	4
	Microfracture	5
	Remodelling	6
	Total	25

Menisci calcification	None	0
	1	1
	2	2
Number of visible osteophytes - Medial tibial condyle	None	0
	Small	1
	Moderate - Severe	2
- Medial femoral condyle	None	0
	Small	1
	Moderate - Severe	2
- Medial fabella	None	0
	Small	1
Structural modifications of subchondral bone (sclerosis)	None	0
	Low - Moderate	1
	Moderate - High	2
Width of the joint space	Normal	0
	Reduced	1
	Absent	2
Calcification of tendons and ligaments	None	0
	1 site	1
	> 1 site	2
	Total	13

	Standard	GlcN	HT	PCy	HT/PCy
Total body weight (g)					
Week 0	19.7 ± 0.3	19.8 ± 0.2	19.2 ± 0.7	19.0 ± 0.0	18.8 ± 0.9
Week 12	25.5 ± 0.4	25.2 ± 0.8	23.8 ± 1.0	26.0 ± 1.0	24.5 ± 0.6
Weight taken between week 0 and week 12 (g)	5.8 ± 0.3	5.3 ± 0.6	4.6 ± 0.5	6.5 ± 1.0	5.6 ± 1.2

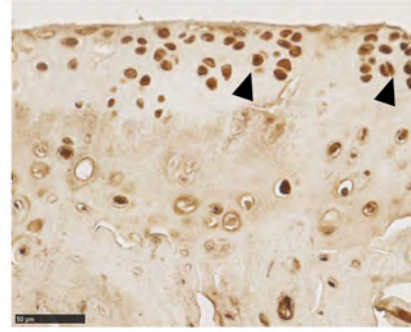
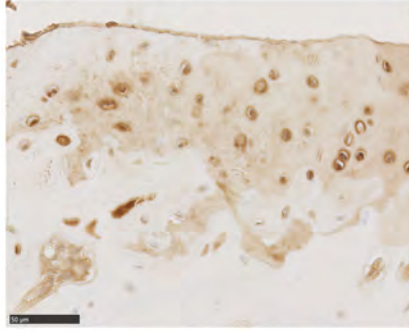
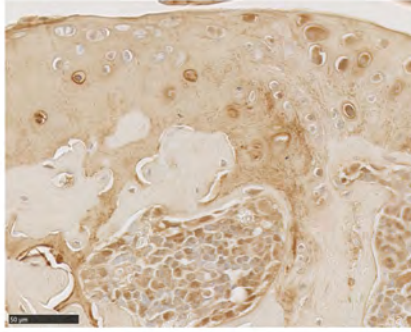


Coll 2

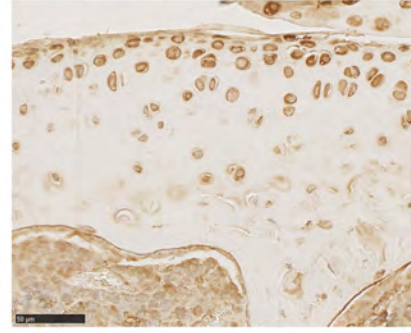
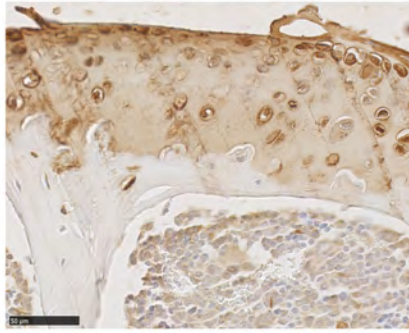
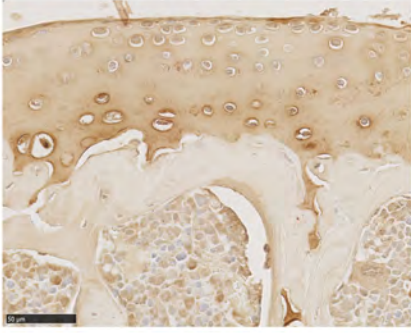
ACAN

NITEGE

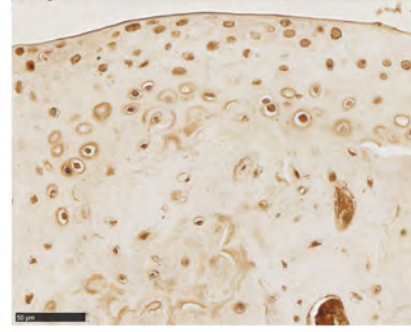
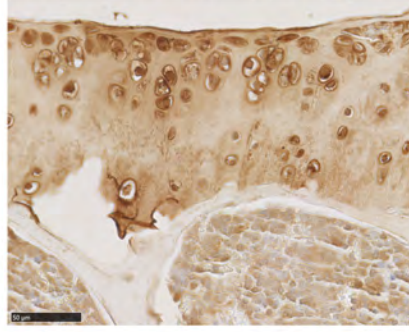
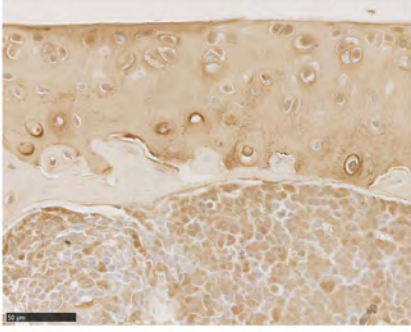
Ct



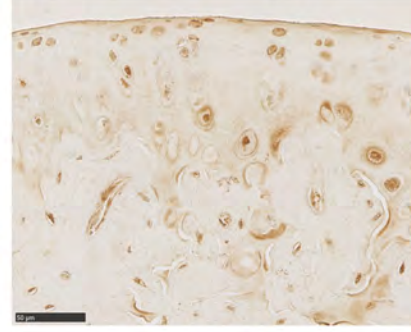
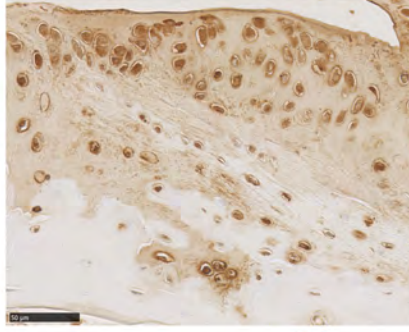
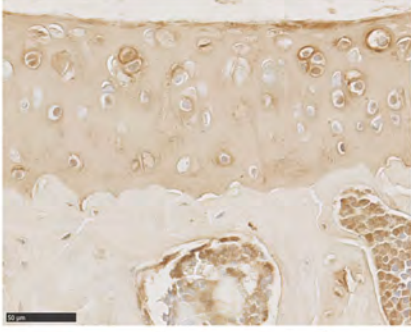
GlcN



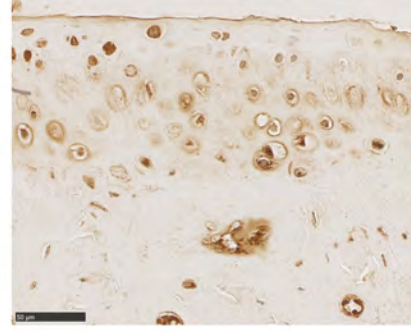
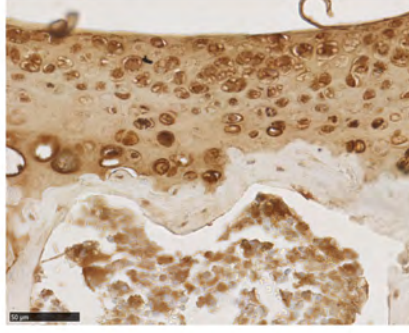
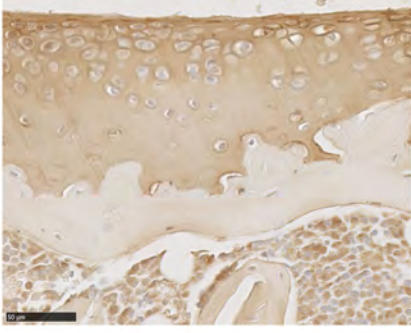
HT



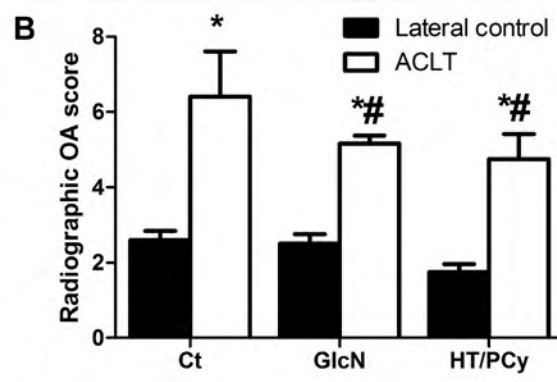
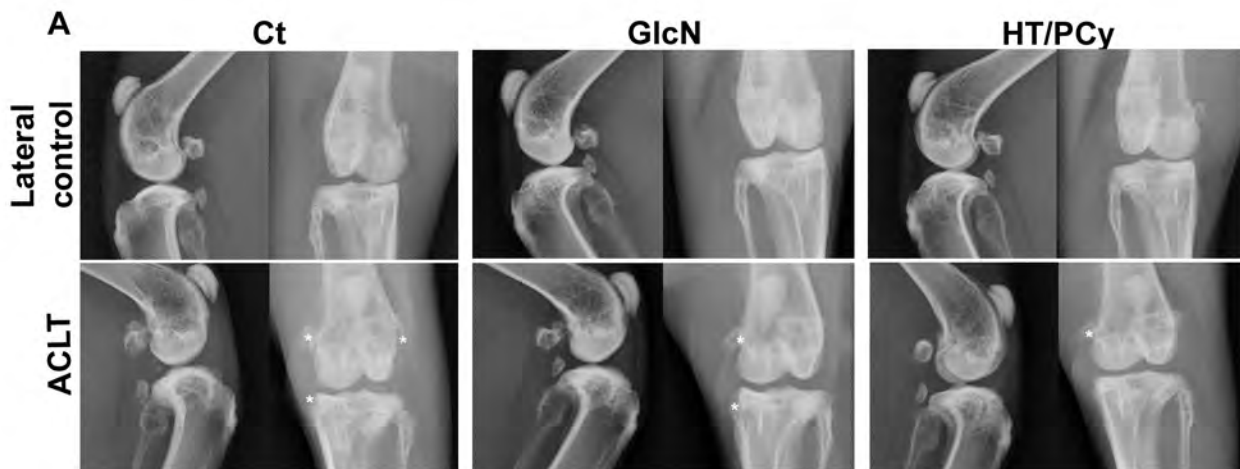
PCy

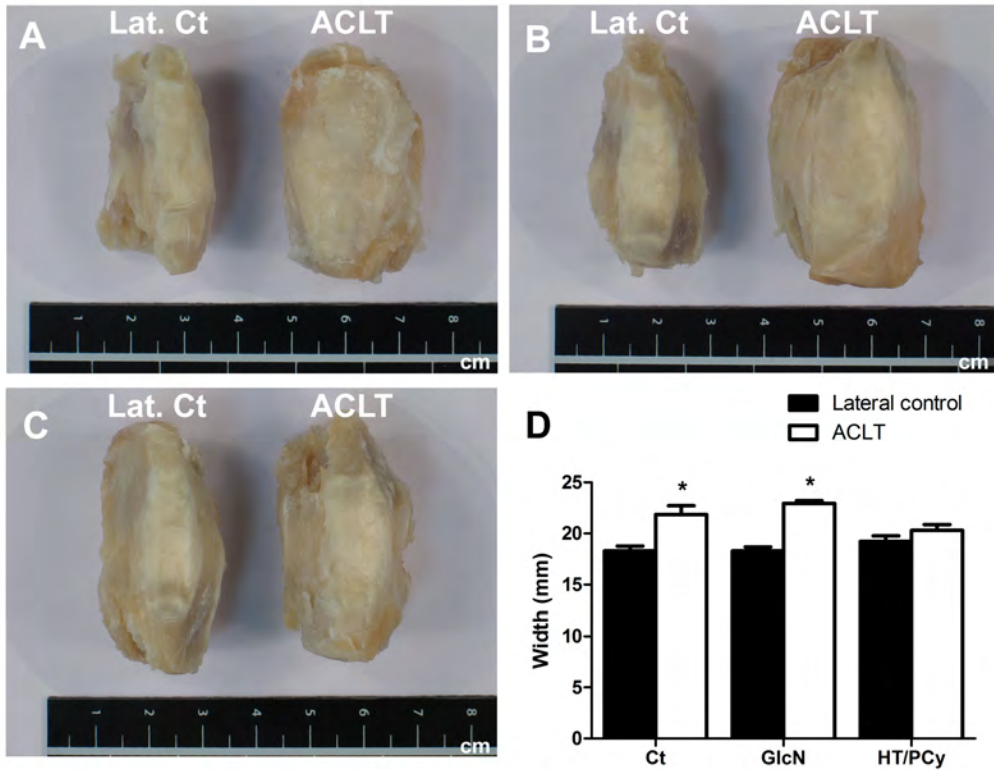


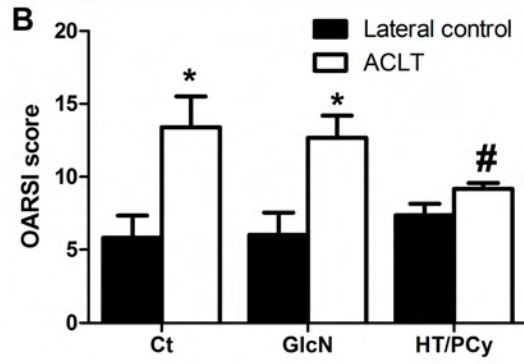
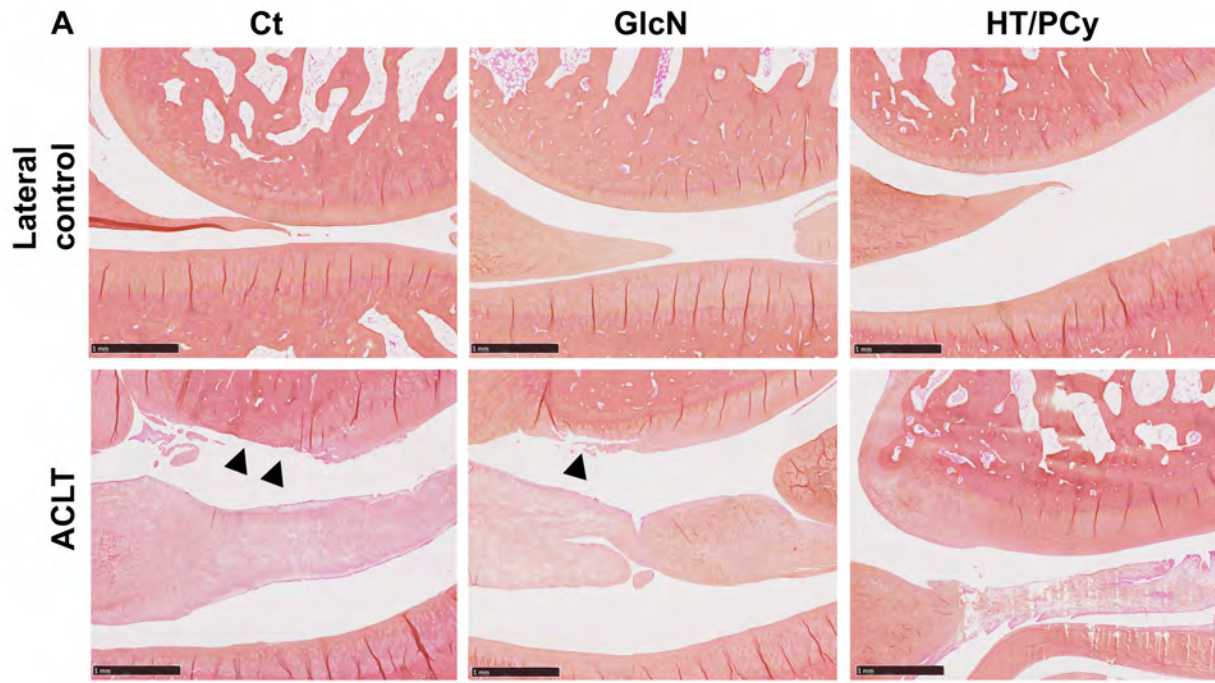
HT/PCy

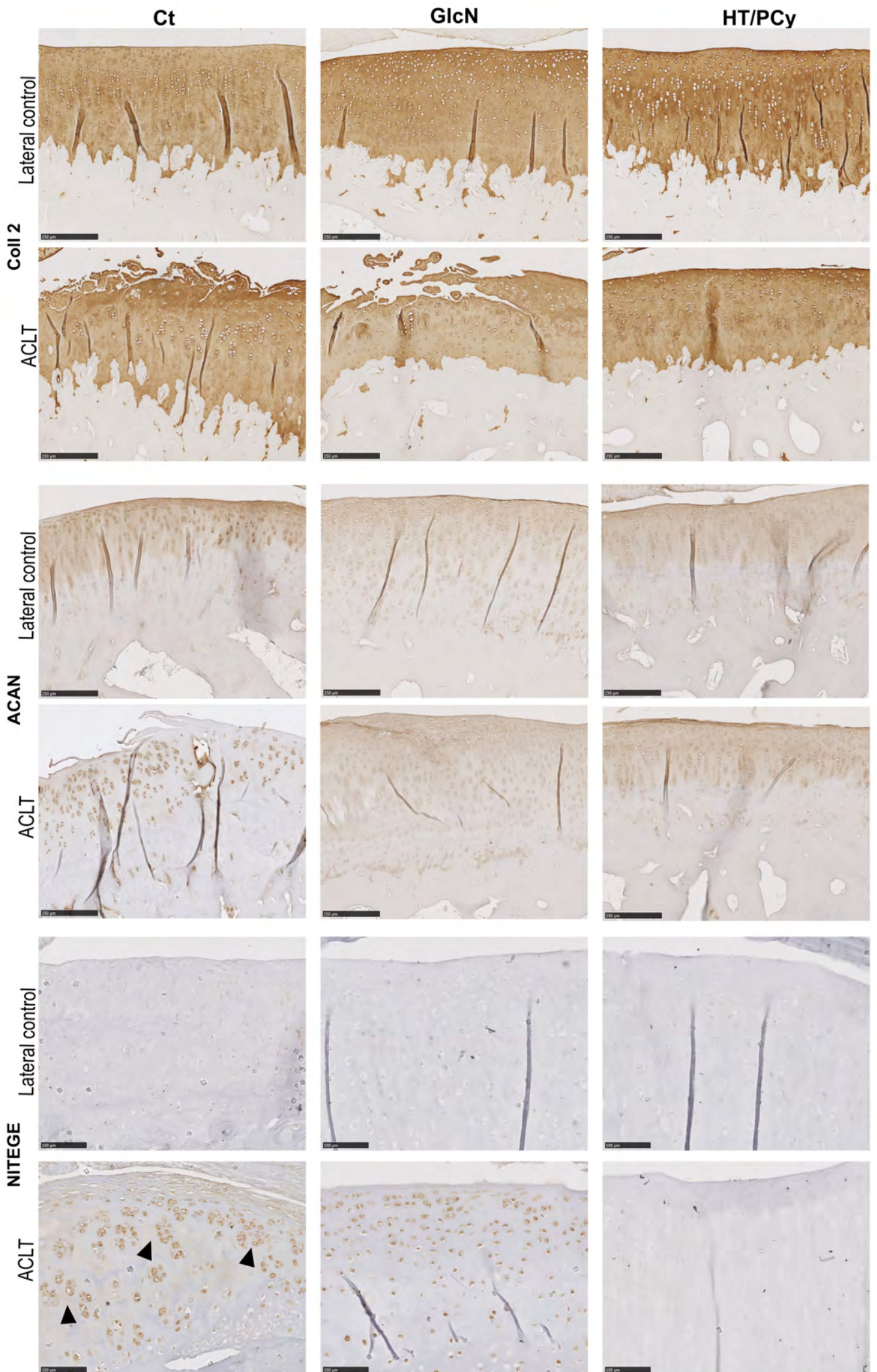


	Standard	GlcN	HT/PCy
Total body weight (kg)			
Week 0	3.77 ± 0.11	4.04 ± 0.18	3.90 ± 0.08
Week 13	4.58 ± 0.15	4.68 ± 0.23	4.85 ± 0.11
Weight taken between week 0 and week 13 (kg)	0.81 ± 0.10	0.64 ± 0.07	0.60 ± 0.07









IV- CONCLUSION GÉNÉRALE & DISCUSSION

Avec le vieillissement de la population, le nombre de patients atteints d'arthrose tend à s'accroître. Cependant, l'arsenal thérapeutique actuellement proposé permet uniquement de soulager les symptômes douloureux et inflammatoires mais ne s'intéresse pas à l'origine de la maladie. Pourtant, notre connaissance actuelle des mécanismes conduisant à l'inflammation et à la dégradation du cartilage offre des perspectives thérapeutiques intéressantes. Aujourd'hui, l'enjeu des recherches consiste à prévenir l'apparition des lésions arthrosiques, notamment, en ciblant les origines moléculaires de la maladie. Ce travail de thèse s'est ainsi inscrit dans ce contexte. Notre étude a eu pour objectif d'étudier l'intérêt de l'utilisation de procyanidines et d'hydroxytyrosol dans le développement d'une nouvelle stratégie préventive nutritionnelle pour la prise en charge de l'arthrose. Pour répondre à cette problématique, une approche translationnelle qui combine des modèles complémentaires *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* a été mise en œuvre.

Choix du modèle d'étude *in vitro* :

De nombreuses études se sont attachées à démontrer les effets biologiques des nutraceutiques dans la prévention ou le traitement de l'arthrose. Le schéma expérimental des études de ce type est toujours sensiblement le même : l'effet d'un extrait est évalué dans un modèle de chondrocytes isolés de différentes origines (humain, souris, rat, lapin), plus rarement dans des explants, suite à un stimulus (*e.g.* IL-1 β , TNF- α ,...) sur des biomarqueurs de l'inflammation (*e.g.* IL-1, NO, PGE₂,...) et du catabolisme de l'arthrose (MMP, ADAMTS,...) (Henrotin *et al.* 2011). De précédentes études ont ainsi démontré l'effet chondroprotecteur de composés phénoliques tels que la morine (Chen *et al.* 2012), d'acide chlorogénique (Chen WP 2011), la dephinidine (Haseeb *et al.* 2013) ou encore le curcumin et le resvératrol (Csaki *et al.* 2009) médié par la voie NF- κ B. Dans cette étude, les effets des extraits de raisin et/ou d'olive et les voies de signalisation impliquées ont été évalués en suivant un schéma expérimental similaire. Sans surprise, la première partie de notre travail montre que les procyanidines et l'hydroxytyrosol extraits de pépins de raisin et d'olive sont capables de réduire les effets de l'IL-1 β sur des biomarqueurs de l'inflammation et du catabolisme (NO, PGE₂, MMP-13) dans des modèles de chondrocytes isolés et d'explants de cartilage. En accord avec de précédentes études, ce travail souligne que l'inhibition de la voie NF- κ B intervient dans l'effet préventif attribué aux extraits. Il existe probablement d'autres mécanismes d'action de ces composés, qui n'ont pas été évalués ici. En effet, d'autres composés phénoliques tels que la morine (Chen *et al.* 2012), la sésamine (Phitak *et al.* 2012) ou encore la tétrandrine (Zhou *et al.* 2013) sont capables de contrer les effets délétères de l'IL-1 β dans les chondrocytes en inhibant les voies de signalisation des MAPK et Wnt/ β -caténine. Au final, la complexité des mécanismes d'actions impliqués met en avant la nécessité de se tourner vers des approches *in vivo* en prenant en compte la physiologie générale des composés phénoliques après administration.

Choix de l'administration orale dans la prévention nutritionnelle :

Dans le cadre du développement de stratégies préventives de l'arthrose, le mode d'administration du traitement par voie orale est largement privilégié à la voie locale. Cette voie d'administration offre les avantages d'être moins invasive et coûteuse, plus pratique et enfin permet une bonne observance. Cependant, ce mode d'administration présente des risques d'altération de la molécule active, notamment par le biais d'une transformation ou encore de l'action des sucs gastriques. Ainsi, il est nécessaire de mener des analyses permettant d'évaluer le devenir d'une molécule après son ingestion, dites d'ADME (*i.e.* absorption, distribution, métabolisme et excrétion). Différents travaux publiés antérieurement, ont mis en évidence la présence de métabolites de l'hydroxytyrosol et des procyanidines dans le sérum après consommation orale (de la Torre-Carbot *et al.* 2006; Suarez *et al.* 2009; Urpi-Sarda *et al.* 2009; Serra *et al.* 2011; Mateos-Martin *et al.* 2012; Rubio *et al.* 2012; Arola-Arnal *et al.* 2013; Goodrich and Neilson 2014). Cela suggère d'une part que ces molécules ont traversé la barrière intestinale afin de rejoindre la circulation sanguine et d'autre part qu'elles ont subi des modifications intestinales ou hépatiques (*e.g.* ajout de groupement sulfate, glucuronide ou méthyl). En revanche ces études ne fournissent aucune information quant à la bioactivité des extraits et leurs métabolites après ingestion. L'originalité de notre étude réside dans l'analyse de la biodisponibilité des extraits dans le sérum après ingestion et à l'analyse *in vitro* de la capacité du sérum à diminuer les biomarqueurs évalués précédemment. Ainsi, notre étude a montré que les extraits après avoir traversé la membrane intestinale et subi des transformations sont présents sous forme de métabolites dans le sérum et conservent leur effet chondroprotecteur sur les biomarqueurs induits par l'IL-1 β . Cela a été démontré chez le lapin ayant un régime alimentaire herbivore et chez le chien ayant un régime alimentaire omnivore plus proche de l'homme. Cependant, l'excrétion et la biodisponibilité des extraits dans les différents organes n'ont pas été évaluées et mériteraient davantage d'investigations. L'ensemble de ces résultats renforce le potentiel effet préventif de l'hydroxytyrosol et/ou des procyanidines dans la prévention de l'arthrose et devra être confirmé dans des modèles précliniques d'arthrose.

Etudes *in vivo* et comparaison avec le nutraceutique de référence, la glucosamine :

La glucosamine a fait l'objet de nombreuses analyses précliniques et cliniques qui montrent son effet bénéfique pour soulager les symptômes de l'arthrose (Tiralocche *et al.* 2005; Towheed *et al.* 2005; Henrotin *et al.* 2012). Ces découvertes en font aujourd'hui l'un des nutraceutiques les plus populaires dans la prise en charge des patients. Ainsi, dans la seconde partie de ce travail nous avons choisi d'étudier les effets de l'hydroxytyrosol et/ou des procyanidines dans la prévention de l'arthrose en comparaison avec la glucosamine, molécule de référence. Dans un premier temps, les effets des extraits ont été évalués dans un modèle d'arthrose induite par DMM chez la souris. Ce modèle qui

est parfaitement décrit et facilement accessible (Glasson *et al.* 2007) nous a permis de tester l'intégralité des extraits dans le but de sélectionner le plus prometteur. Dans cette étude chez la souris, nous avons mis en évidence que les extraits diminuent la sévérité de l'arthrose provoquée par la chirurgie. En revanche aucune différence significative entre les différents groupes traités n'a été décelée. Cependant, les résultats obtenus lors des expérimentations *in vivo* ont révélés que le mélange d'extraits avait un effet plus important sur certains des biomarqueurs observés. De plus, les analyses de bioactivité chez le chien ont été réalisées uniquement avec le mélange de procyanidines et d'hydroxytyrosol. Ainsi, nous avons décidé de poursuivre l'étude uniquement avec le mélange d'hydroxytyrosol et de procyanidines dans un second modèle d'arthrose induite chez le lapin. Dans ce modèle, la pathologie est induite par section du LCA chez le lapin, plus proche de l'étiologie de la maladie humaine post traumatique (Bendele 2001). Ainsi, grâce à des observations macroscopiques complétées par des analyses histologiques, radiographique et moléculaire nos résultats apportent la confirmation quant à l'action de l'extrait dans la prévention de l'arthrose. De manière très intéressante, au cours de cette étude chez le lapin nous avons pu mettre en évidence un effet plus important du mélange d'extraits que la glucosamine. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'extrait d'hydroxyrosol combiné aux procyanidines est un extrait très prometteur dans le développement de stratégies préventives de l'arthrose.

Les limites analytiques d'un modèle *in vivo* d'arthrose présentant une sévérité précoce à moyenne:

L'avantage de l'utilisation de modèle animaux d'arthrose induite chirurgicalement est que cela permet de moduler la sévérité de l'arthrose en faisant varier notamment le temps d'induction. Dans la littérature, les temps d'induction pour des modèles d'arthrose induite chez la souris par DMM varient entre 6 et 16 semaines (Moodie *et al.* 2011; Chen *et al.* 2015) et chez le lapin ayant subi une ACLT, ce temps se situe entre 4 et 16 semaines (Huang *et al.* 2015; Makela *et al.* 2015). Dans le cadre de la mise en place d'un traitement préventif de l'arthrose, l'utilisation d'un modèle présentant une arthrose de sévérité précoce à moyenne nous paraissait plus appropriée. Ainsi, dans cette étude, les animaux ont été euthanasiés respectivement à 8 semaines et 10 semaines post-chirurgie pour les souris et les lapins. Bien que l'on ait démontré les effets bénéfiques des extraits dans la prévention de l'arthrose, ces modèles ne nous ont pas permis l'évaluation de paramètres moléculaires et fonctionnels.

Évaluation du catabolisme de la fibuline

Au cours de l'arthrose, la dégradation du cartilage articulaire s'accompagne de la libération de fragments de la matrice tels que la fibuline. Le fragment (fib3-2) issu du catabolisme est ainsi retrouvé dans les urines et le sérum d'animaux (Horcajada *et al.* 2015) ou de patients arthrosiques

(Henrotin *et al.* 2012). Afin de démontrer l'effet bénéfique de la supplémentation de l'alimentation en hydroxytyrosol et/ou procyanidines dans la prévention de l'arthrose nous avons cherché à déterminer si les extraits avaient une incidence sur la libération de la fib3-2. Ainsi, en collaboration avec l'entreprise Artialis (Liège, Belgique), la fib3-2 a été dosée 8 semaines suivant la DMM dans les séras de souris ayant reçu une alimentation supplémentée. Ce dosage n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes de l'étude (Figure 19). L'absence de données sur le sérum de souris non opérées ne nous permet pas de conclure si les extraits n'ont aucun effet sur la dégradation et la libération de fib3-2 dans le sérum ou si les fragments ne sont pas mesurables à un stade précoce de la maladie. Afin de répondre à cette interrogation, une expérimentation mesurant la quantité de fib3-2 dans le sérum de souris 8 semaines après la DMM ainsi que dans le sérum de souris dont le ligament ménisquo-tibial n'a pas été sectionné est actuellement en cours. Il serait également envisageable de réaliser une étude de libération de fib3-2 au cours du temps dans le sérum après DMM. Complétée par une étude histologique cela permettrait de corrélérer la sévérité de l'arthrose à la quantité de fib3-2 présente dans le sérum dans ce modèle.

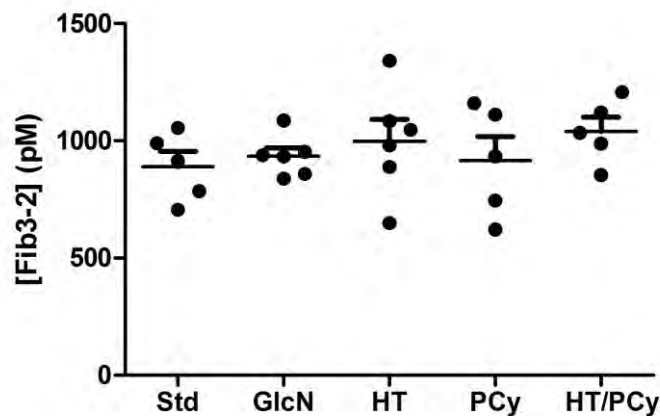


Figure 19 : Dosage Fib3-2 réalisée sur des séras de souris ayant reçu une alimentation supplémentée ou non 8 semaines après chirurgie (DMM).

Analyse fonctionnelle

Le Catwalk® est un système permettant une analyse fine de la marche. Ce système consiste en un couloir en verre éclairé par une lampe LED, traversé par les animaux. L'acquisition de la réflexion des pattes se fait par une caméra à haute fréquence positionnée en dessous du couloir lumineux. Cet outil, développé à l'origine dans le domaine de la neurologie (*e.g.* analyse de lésions neurologiques) s'est peu à peu étendu à d'autres domaines de recherches. Depuis peu, des équipes ont utilisés cette nouvelle approche d'analyse dans le domaine de la rhumatologie, et en particulier l'arthrite et l'arthrose. Plusieurs études récentes ont démontré l'intérêt de l'utilisation du Catwalk® pour l'analyse de l'efficacité de traitements anti-arthrosiques en préclinique chez la souris ou encore le rat

(Ferland *et al.* 2012; Zhen *et al.* 2013; Muramatsu *et al.* 2014; Ishikawa *et al.* 2015). De ce fait, nous avons souhaité compléter notre travail chez la souris par une analyse fonctionnelle à l'aide du système d'acquisition Catwalk®. Pour cela, des acquisitions ont été réalisées quelques jours avant la chirurgie bilatérale, puis toutes les semaines jusqu'à l'euthanasie (8 semaines post-chirurgie). Malheureusement, cette analyse ne nous a pas permis d'obtenir des résultats suffisamment solides pour pouvoir démontrer les effets bénéfiques d'un ou plusieurs traitements. Cela s'explique probablement par le temps d'induction de l'arthrose court (8 semaines). Ces suppositions sont cohérentes avec celles de travaux publiés antérieurement qui démontre des effets visibles de traitement sur la mobilité de souris à 12 et 16 semaines après la DMM unilatérale (Muramatsu *et al.* 2014).

Perspectives et propositions de valorisation de l'étude :

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives de recherches sur l'effet préventif des composés phénoliques issus d'extraits de raisin et d'olive dans la prévention des maladies ostéo-articulaires et en particulier l'arthrose. Ainsi, il pourrait être envisageable de poursuivre l'étude portant sur la prévention de l'arthrose par une approche nutritionnelle à l'aide des extraits testés dans cette étude. Bien que la biodisponibilité dans le sang et la bioactivité des extraits après ingestion orale ait été démontré au cours de ce travail, il n'y a actuellement aucune preuve de la présence des extraits ou leurs métabolites au sein de l'articulation. Le liquide synovial, présent dans les articulations, est un ultrafiltrat du sang, ainsi, sa composition en micronutriments est très proche de celle du sérum sanguin qui l'alimente (Huber *et al.* 2000). On peut ainsi aisément imaginer que les extraits ainsi que leurs métabolites soient acheminés par la circulation sanguine jusqu'à atteindre le liquide synovial et exercer leurs effets *in situ*. L'enjeu consiste à présent à déterminer d'une part si les résultats de biodisponibilité dans le sérum et la bioactivité se confirment chez l'homme et d'autre part, si ces extraits pourraient être biodisponibles au niveau de l'articulation, dans le liquide synovial. Pour des raisons évidentes de taille des modèles animaux (lapin et chien) dans lesquels ces premières analyses ont été menées, l'analyse de la présence des extraits au niveau du liquide synovial étant difficilement envisageable. Pour tenter de répondre à cette problématique, nous avons élaboré une étude clinique exploratrice randomisée en double aveugle. Ce travail consiste d'une part à confirmer chez l'homme la capacité anti-inflammatoire d'un sérum de patient dont l'alimentation aura été complétée durant 7 jours avec un extrait de raisin et d'olive, en comparaison avec un groupe ayant reçu un traitement placebo. D'autre part, l'objectif secondaire de cette étude est d'apprécier la nature de la composition qualitative du sérum et du liquide synovial après supplémentation de l'alimentation avec le nutraceutique. Cette étude clinique en collaboration avec le CHU de Nantes et le P^r Yves Maugars (service de Rhumatologie) débutera en Novembre 2015, et inclura 20 patients atteints de

gonarthrose et nécessitant une viscosupplémentation. Sur la base des résultats de cette étude exploratrice, une étude clinique de plus grande envergure devra être mise en place dans le but de déposer un dossier de demande d'allégation auprès de l'ENSA. Une stratégie préventive consisterait à inclure des patients dits « à risques » qui ne présentent pas d'arthrose radiographique. Ces patients seraient invités à recevoir soit un traitement à base d'hydroxytyrosol couplé à des procyanidines soit le placebo pendant plusieurs mois voire plusieurs années et évaluer au terme de ce traitement si les patients ayant reçu le traitement présentent moins d'arthrose que le groupe placebo. Ce type d'étude clinique nécessiterait de nombreuses inclusions afin d'obtenir une puissance statistique suffisante, se révélerait très coûteuse et très longue. Pour toutes ces raisons, il serait plus raisonnable d'imaginer une étude clinique dans le cadre de la mise en place d'une stratégie curative et non préventive. Les patients inclus seraient alors des personnes présentant déjà des signes radiographiques d'arthrose et qui seraient amenés à recevoir un traitement ou le placebo pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Cela permettrait de connaître la capacité des extraits à ralentir l'évolution de l'arthrose.

La micronutrition est une discipline nouvelle qui trouve ces fondements dans des études établissant un lien avéré entre alimentation, santé et prévention. Les consultations en micronutrition sont de plus en plus courantes. Elles sont réalisées par des médecins ou plus rarement par des pharmaciens ayant un diplôme universitaire en micronutrition. L'objectif des consultations en micronutrition est d'évaluer le statut en micronutriments des patients et proposer des protocoles nutritionnels adaptés et associer si nécessaire à une complémentation personnalisée. Le but est d'optimiser le statut micronutritionnel permettant de couvrir tous les besoins pour atteindre ce que l'on appelle un état de santé optimal (*e.g.* physique, esprit,...). Dans le cadre de ces consultations, il est tout à fait envisageable de conseiller la supplémentation de l'alimentation en hydroxytyrosol/procyanidines aux patients présentant un risque important de développer une arthrose (*e.g.* âge, poids,...). Bien que cette discipline soit en essor, il est évident qu'une minorité de la population s'oriente vers ce type de consultation, on pourrait ainsi imaginer de valoriser notre travail par une importante communication auprès des professionnels de la santé (pharmaciens, médecins généralistes, rhumatologues) afin d'inclure la prévention nutritionnelle à base d'un extrait d'hydroxytyrosol/procyanidines dans l'arsenal thérapeutique de la prise en charge de l'arthrose.

V- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal, C., R. Veluri, M. Kaur, S. C. Chou, J. A. Thompson and R. Agarwal (2007). "Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells." *Carcinogenesis* **28**(7): 1478-84.
- Ahrman, E., P. Lorenzo, K. Holmgren, A. J. Grodzinski, L. E. Dahlber, T. Saxne, D. Heinegard and P. Onnerfjord (2014). "Novel cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neoepitopes identified in synovial fluids from patients with joint diseases using affinity chromatography and mass spectrometry." *J Biol Chem* **289**(30): 20908-16.
- Aigner, T. and J. Stove (2003). "Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(12): 1569-93.
- Aini, H., H. Ochi, M. Iwata, A. Okawa, D. Koga, M. Okazaki, A. Sano and Y. Asou (2012). "Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model." *PLoS One* **7**(5): e37728.
- Aktas, E., E. Sener and P. U. Gocun (2011). "Mechanically induced experimental knee osteoarthritis benefits from anti-inflammatory and immunomodulatory properties of simvastatin via inhibition of matrix metalloproteinase-3." *J Orthop Traumatol* **12**(3): 145-51.
- Ali, S. Y., L. Evans, E. Stainthorpe and C. H. Lack (1967). "Characterization of cathepsins in cartilage." *Biochem J* **105**(2): 549-57.
- Alsalameh, S., R. Amin, T. Gemba and M. Lotz (2004). "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." *Arthritis Rheum* **50**(5): 1522-32.
- Ameye, L. G. and W. S. Chee (2006). "Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence." *Arthritis Res Ther* **8**(4): R127.
- Amin, A. R., M. Dave, M. Attur and S. B. Abramson (2000). "COX-2, NO, and cartilage damage and repair." *Curr Rheumatol Rep* **2**(6): 447-53.
- Amin, S., J. Niu, A. Guerhazi, M. Grigoryan, D. J. Hunter, M. Clancy, M. P. LaValley, H. K. Genant and D. T. Felson (2007). "Cigarette smoking and the risk for cartilage loss and knee pain in men with knee osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* **66**(1): 18-22.
- Anderson, J. W. and A. R. Waters (2013). "Raisin consumption by humans: effects on glycemia and insulinemia and cardiovascular risk factors." *J Food Sci* **78 Suppl 1**: A11-7.
- Andriambeloson, E., J. C. Stoclet and R. Andriantsitohaina (1999). "Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta." *Journal of cardiovascular pharmacology* **33**(2): 248-254.
- Anwer, S., A. Alghadir and J. M. Brismee (2015). "Effect of Home Exercise Program in Patients With Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis." *J Geriatr Phys Ther*.
- Appelboom, T., J. Schuermans, G. Verbruggen, Y. Henrotin and J. Y. Reginster (2001). "Symptoms modifying effect of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) in knee osteoarthritis. A double blind, prospective, placebo-controlled study." *Scand J Rheumatol* **30**(4): 242-7.
- Arola-Arnal, A., G. Oms-Oliu, A. Crescenti, J. M. del Bas, M. R. Ras, L. Arola and A. Caimari (2013). "Distribution of grape seed flavanols and their metabolites in pregnant rats and their fetuses." *Mol Nutr Food Res* **57**(10): 1741-52.
- Ateshian, G. A. (2007). "Artificial cartilage: weaving in three dimensions." *Nat Mater* **6**(2): 89-90.
- Attur, M., H. E. Al-Mussawir, J. Patel, A. Kitay, M. Dave, G. Palmer, M. H. Pillinger and S. B. Abramson (2008). "Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor." *J Immunol* **181**(7): 5082-8.
- Avelar, M. M. and C. M. Gouvea (2012). "Procyanidin b2 cytotoxicity to mcf-7 human breast adenocarcinoma cells." *Indian J Pharm Sci* **74**(4): 351-5.
- Baba, S., N. Osakabe, M. Natsume and J. Terao (2002). "Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in rats." *Free Radic Biol Med* **33**(1): 142-8.
- Bao, J. P., L. F. Jiang, J. Li, W. P. Chen, P. F. Hu and L. D. Wu (2014). "Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor inhibits interleukin-1beta-induced catabolic and inflammatory responses in murine chondrocytes." *Mol Med Rep* **10**(4): 2191-7.

- Bauge, C., N. Girard, E. Lhuissier, C. Bazille and K. Boumediene (2014). "Regulation and Role of TGFbeta Signaling Pathway in Aging and Osteoarthritis Joints." *Aging Dis* **5**(6): 394-405.
- Belcaro, G., M. R. Cesarone, S. Errichi, C. Zulli, B. M. Errichi, G. Vinciguerra, A. Ledda, A. Di Renzo, S. Stuard, M. Dugall, L. Pellegrini, G. Gizzi, E. Ippolito, A. Ricci, M. Cacchio, G. Cipollone, I. Ruffini, F. Fano, M. Hosoi and P. Rohdewald (2008). "Treatment of osteoarthritis with Pycnogenol. The SVOS (San Valentino Osteo-arthritis Study). Evaluation of signs, symptoms, physical performance and vascular aspects." *Phytother Res* **22**(4): 518-23.
- Belcaro, G., M. R. Cesarone, S. Errichi, C. Zulli, B. M. Errichi, G. Vinciguerra, A. Ledda, A. Di Renzo, S. Stuard, M. Dugall, L. Pellegrini, G. Gizzi, E. Ippolito, A. Ricci, M. Cacchio, G. Cipollone, I. Ruffini, F. Fano, M. Hosoi and P. Rohdewald (2008). "Variations in C-reactive protein, plasma free radicals and fibrinogen values in patients with osteoarthritis treated with Pycnogenol." *Redox Rep* **13**(6): 271-6.
- Bellamy, N., J. Campbell, V. Robinson, T. Gee, R. Bourne and G. Wells (2006). "Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD005321.
- Bendele, A. M. (2001). "Animal models of osteoarthritis." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **1**(4): 363-76.
- Berenbaum, F. (2000). "Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation." *Joint Bone Spine* **67**(6): 561-4.
- Berenbaum, F. (2004). "Signaling transduction: target in osteoarthritis." *Curr Opin Rheumatol* **16**(5): 616-22.
- Berenbaum, F., F. Eymard and X. Houard (2013). "Osteoarthritis, inflammation and obesity." *Curr Opin Rheumatol* **25**(1): 114-8.
- Bernini, R., F. Crisante, N. Merendino, R. Molinari, M. C. Soldatelli and F. Velotti (2011). "Synthesis of a novel ester of hydroxytyrosol and alpha-lipoic acid exhibiting an antiproliferative effect on human colon cancer HT-29 cells." *Eur J Med Chem* **46**(1): 439-46.
- Bianco, P. and P. G. Robey (2015). "Skeletal stem cells." *Development* **142**(6): 1023-7.
- Bijlsma, J. W., F. Berenbaum and F. P. Lafeber (2011). "Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice." *Lancet* **377**(9783): 2115-26.
- Bird, H. A. and L. Barton (1993). "Joint hyperlaxity and its long-term effects on joints." *J R Soc Health* **113**(6): 327-9.
- Bitzer, Z. T., S. L. Glisan, M. R. Dorenkott, K. M. Goodrich, L. Ye, S. F. O'Keefe, J. D. Lambert and A. P. Neilson (2015). "Cocoa procyanidins with different degrees of polymerization possess distinct activities in models of colonic inflammation." *J Nutr Biochem* **26**(8): 827-31.
- Blanco, F. J., R. L. Ochs, H. Schwarz and M. Lotz (1995). "Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide." *Am J Pathol* **146**(1): 75-85.
- Blobel, C. P. (1997). "Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch." *Cell* **90**(4): 589-92.
- Blom, A. B., P. M. van der Kraan and W. B. van den Berg (2007). "Cytokine targeting in osteoarthritis." *Curr Drug Targets* **8**(2): 283-92.
- Blotman, F., E. Maheu, A. Wulwik, H. Caspard and A. Lopez (1997). "Efficacy and safety of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee and hip. A prospective, multicenter, three-month, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Rev Rhum Engl Ed* **64**(12): 825-34.
- Bonanome, A., A. Pagnan, D. Caruso, A. Toia, A. Xamin, E. Fedeli, B. Berra, A. Zamburlini, F. Ursini and G. Galli (2000). "Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **10**(3): 111-20.
- Bondeson, J., S. Lauder, S. Wainwright, N. Amos, A. Evans, C. Hughes, M. Feldmann and B. Caterson (2007). "Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor IkappaBalpha into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor-kappaB-dependent." *J Rheumatol* **34**(3): 523-33.

- Bouallagui, Z., J. Han, H. Isoda and S. Sayadi (2011). "Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells." *Food Chem Toxicol* **49**(1): 179-84.
- Boulais, P. E. and P. S. Frenette (2015). "Making sense of hematopoietic stem cell niches." *Blood* **125**(17): 2621-9.
- Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." *N Engl J Med* **331**(14): 889-95.
- Bruyere, O., N. Burlet, P. D. Delmas, R. Rizzoli, C. Cooper and J. Y. Reginster (2008). "Evaluation of symptomatic slow-acting drugs in osteoarthritis using the GRADE system." *BMC Musculoskelet Disord* **9**: 165.
- Bruyere, O., C. Cooper, J. P. Pelletier, J. Branco, M. Luisa Brandi, F. Guillemin, M. C. Hochberg, J. A. Kanis, T. K. Kvien, J. Martel-Pelletier, R. Rizzoli, S. Silverman and J. Y. Reginster (2014). "An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: a report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)." *Semin Arthritis Rheum* **44**(3): 253-63.
- Buckwalter, J. A. and J. A. Martin (2006). "Osteoarthritis." *Adv Drug Deliv Rev* **58**(2): 150-67.
- Bulotta, S., M. Celano, S. M. Lepore, T. Montalcini, A. Pujia and D. Russo (2014). "Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases." *J Transl Med* **12**: 219.
- Burrage, P. S. and C. E. Brinckerhoff (2007). "Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors." *Curr Drug Targets* **8**(2): 293-303.
- Burton-Wurster, N., J. P. Farese, R. J. Todhunter and G. Lust (1999). "Site-specific variation in femoral head cartilage composition in dogs at high and low risk for development of osteoarthritis: insights into cartilage degeneration." *Osteoarthritis Cartilage* **7**(5): 486-97.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece, Eds. (2004). *Biologie*. Paris, DE BOECK UNIVERSITÉ.
- Carbonneau, M. A., C. L. Leger, L. Monnier, C. Bonnet, F. Michel, G. Fouret, F. Dedieu and B. Descomps (1997). "Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location." *Eur J Clin Nutr* **51**(10): 682-90.
- Carnesecchi, S., Y. Schneider, S. A. Lazarus, D. Coehlo, F. Gosse and F. Raul (2002). "Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells." *Cancer Lett* **175**(2): 147-55.
- Caruso, D., F. Visioli, R. Patelli, C. Galli and G. Galli (2001). "Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans." *Metabolism* **50**(12): 1426-8.
- Centeno, C. J., D. Busse, J. Kisiday, C. Keohan, M. Freeman and D. Karli (2008). "Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells." *Pain Physician* **11**(3): 343-53.
- Centeno, C. J., D. Busse, J. Kisiday, C. Keohan, M. Freeman and D. Karli (2008). "Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells." *Med Hypotheses* **71**(6): 900-8.
- Cermak, R. (2008). "Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**(1): 17-35.
- Chabane, N., N. Zayed, H. Afif, L. Mfuna-Endam, M. Benderdour, C. Boileau, J. Martel-Pelletier, J. P. Pelletier, N. Duval and H. Fahmi (2008). "Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage* **16**(10): 1267-74.
- Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton and D. L. Simmons (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13926-31.

- Cheah, K. Y., G. S. Howarth, K. A. Bindon, J. A. Kennedy and S. E. Bastian (2014). "Low molecular weight procyanidins from grape seeds enhance the impact of 5-Fluorouracil chemotherapy on Caco-2 human colon cancer cells." *PLoS One* **9**(6): e98921.
- Chen, C. W., J. Sun, Y. M. Li, P. A. Shen and Y. Q. Chen "Action mechanisms of du-huo-ji-sheng-tang on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis." *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**: 571479.
- Chen, F. H., K. T. Rousche and R. S. Tuan (2006). "Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering." *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**(7): 373-82.
- Chen, R., M. Mian, M. Fu, J. Y. Zhao, L. Yang, Y. Li and L. Xu (2015). "Attenuation of the Progression of Articular Cartilage Degeneration by Inhibition of TGF-beta1 Signaling in a Mouse Model of Osteoarthritis." *Am J Pathol*.
- Chen, W. P., P. F. Hu, J. P. Bao and L. D. Wu (2012). "Morin exerts antiosteoarthritic properties: an in vitro and in vivo study." *Exp Biol Med (Maywood)* **237**(4): 380-6.
- Chen WP, T. J., Bao JP, Hu PF, Shi ZL, Wu LD. (2011). "Anti-arthritic effects of chlorogenic acid in interleukin-1 β -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model." *International Immunopharmacology* **11**(1): 23-8.
- Chen, W. P., Y. L. Wang, J. L. Tang, P. F. Hu, J. P. Bao and L. D. Wu (2012). "Morin inhibits interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes." *Int Immunopharmacol* **12**(2): 447-52.
- Chou, S. C., M. Kaur, J. A. Thompson, R. Agarwal and C. Agarwal (2010). "Influence of gallate esterification on the activity of procyanidin B2 in androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells." *Pharm Res* **27**(4): 619-27.
- Chrisman, O. D., I. M. Ladenbauer-Bellis, M. Panjabi and S. Goeltz (1981). "1981 Nicolas Andry Award. The relationship of mechanical trauma and the early biochemical reactions of osteoarthritic cartilage." *Clin Orthop Relat Res*(161): 275-84.
- Christensen, R., E. M. Bartels, A. Astrup and H. Bliddal (2007). "Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis." *Ann Rheum Dis* **66**(4): 433-9.
- Christgau, S., P. Garnero, C. Fledelius, C. Moniz, M. Ensig, E. Gineyts, C. Rosenquist and P. Qvist (2001). "Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation." *Bone* **29**(3): 209-15.
- Christiansen, B. A., S. Bhatti, R. Goudarzi and S. Emami (2015). "Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean Unsaponifiables." *Cartilage* **6**(1): 30-44.
- Chung, C. and J. A. Burdick (2008). "Engineering cartilage tissue." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(2): 243-62.
- Chung, Y. C., C. C. Huang, C. H. Chen, H. C. Chiang, K. B. Chen, Y. J. Chen, C. L. Liu, L. T. Chuang, M. Liu and C. P. Hsu (2012). "Grape-seed procyanidins inhibit the in vitro growth and invasion of pancreatic carcinoma cells." *Pancreas* **41**(3): 447-54.
- Cisar, P., R. Jany, I. Waczulikova, K. Sumegova, J. Muchova, J. Vojtassak, Z. Durackova, M. Lisy and P. Rohdewald (2008). "Effect of pine bark extract (Pycnogenol) on symptoms of knee osteoarthritis." *Phytother Res* **22**(8): 1087-92.
- Clegg, D. O., D. J. Reda, C. L. Harris, M. A. Klein, J. R. O'Dell, M. M. Hooper, J. D. Bradley, C. O. Bingham, 3rd, M. H. Weisman, C. G. Jackson, N. E. Lane, J. J. Cush, L. W. Moreland, H. R. Schumacher, Jr., C. V. Oddis, F. Wolfe, J. A. Molitor, D. E. Yocum, T. J. Schnitzer, D. E. Furst, A. D. Sawitzke, H. Shi, K. D. Brandt, R. W. Moskowitz and H. J. Williams (2006). "Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis." *N Engl J Med* **354**(8): 795-808.
- Clément-Bouheddi, J. (2005). Contribution à l'étude du traitement de lésions du cartilage fémoral par grèffe de chondrocytes dans une colle de fibrine. *Ecole nationale vétérinaire*. Lyon, Claude-Bernard (Lyon 1). **VMD**: 82.
- Clouet, J. (2010). Développement de l'ingénierie tissulaire du disque intervertébral: de la physiopathologie aux modèles animaux. *Odontologie*. Nantes, Université de Nantes. **PhD**: 232.

- Clouet, J., C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-vaucel, Y. Maugars, P. Weiss, G. Grimandi and J. Guicheux (2009). "From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage." Drug Discov Today **14**(19-20): 913-25.
- Clutterbuck, A. L., P. Harris, D. Allaway and A. Mobasheri (2008). "Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse." Vet J **183**(1): 27-38.
- Corona, G., M. Deiana, A. Incani, D. Vauzour, M. A. Dessi and J. P. Spencer (2009). "Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1." Mol Nutr Food Res **53**(7): 897-903.
- Cortial, D., J. Gouttenoire, C. F. Rousseau, M. C. Ronziere, N. Piccardi, P. Msika, D. Herbage, F. Mallein-Gerin and A. M. Freyria (2006). "Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **14**(7): 631-40.
- Corvol, M. T. (2000). "The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis." Joint Bone Spine **67**(6): 557-60.
- Crofford, L. J. (1997). "COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions." J Rheumatol Suppl **49**: 15-9.
- Csaki, C., A. Mobasheri and M. Shakibaei (2009). "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 **11**(6): R165.
- Cutolo, M., F. Berenbaum, M. Hochberg, L. Punzi and J. Y. Reginster (2014). "Commentary on recent therapeutic guidelines for osteoarthritis." Semin Arthritis Rheum.
- Daccache, A., C. Lion, N. Sibille, M. Gerard, C. Slomianny, G. Lippens and P. Cotelle (2011). "Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors." Neurochem Int **58**(6): 700-7.
- Daheshia, M. and J. Q. Yao (2008). "The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis." J Rheumatol **35**(12): 2306-12.
- Dai, S. M., Z. Z. Shan, K. Nishioka and K. Yudoh (2005). "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 **64**(5): 735-42.
- de la Torre-Carbot, K., O. Jauregui, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventos, M. I. Covas, I. Casals and M. C. Lopez-Sabater (2006). "Rapid high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoproteins." J Chromatogr A **1116**(1-2): 69-75.
- de la Torre-Carbot, K., O. Jauregui, E. Gimeno, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventos and M. C. Lopez-Sabater (2005). "Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS." J Agric Food Chem **53**(11): 4331-40.
- De La Torre, R. (2008). "Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans." Inflammopharmacology **16**(5): 245-7.
- Deberg, M., A. Labasse, S. Christgau, P. Cloos, D. Bang Henriksen, J. P. Chapelle, B. Zegels, J. Y. Reginster and Y. Henrotin (2005). "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 **13**(3): 258-65.
- Dell'Agli, M., O. Maschi, G. V. Galli, R. Fagnani, E. Dal Cero, D. Caruso and E. Bosisio (2008). "Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase." Br J Nutr **99**(5): 945-51.
- Demrow, H. S., P. R. Slane and J. D. Folts (1995). "Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries." Circulation **91**(4): 1182-8.

- Deprez, S., I. Mila, J. F. Huneau, D. Tome and A. Scalbert (2001). "Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells." *Antioxid Redox Signal* **3**(6): 957-67.
- Derfoul, A., A. D. Miyoshi, D. E. Freeman and R. S. Tuan (2007). "Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation." *Osteoarthritis Cartilage* **15**(6): 646-55.
- Di Francesco, A., A. Falconi, C. Di Germanio, M. V. Micioni Di Bonaventura, A. Costa, S. Caramuta, M. Del Carlo, D. Compagnone, E. Dainese, C. Cifani, M. Maccarrone and C. D'Addario (2015). "Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms." *J Nutr Biochem* **26**(3): 250-8.
- Dinarello, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." *Blood* **117**(14): 3720-32.
- Dinicola, S., A. Cucina, A. Pasqualato, F. D'Anselmi, S. Proietti, E. Lisi, G. Pasqua, D. Antonacci and M. Bizzarri (2012). "Antiproliferative and apoptotic effects triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines." *Int J Mol Sci* **13**(1): 651-64.
- Dinicola, S., A. Pasqualato, A. Cucina, P. Coluccia, F. Ferranti, R. Canipari, A. Catizone, S. Proietti, F. D'Anselmi, G. Ricci, A. Palombo and M. Bizzarri (2013). "Grape seed extract suppresses MDA-MB231 breast cancer cell migration and invasion." *Eur J Nutr* **53**(2): 421-31.
- Donath, M. Y. and S. E. Shoelson (2011). "Type 2 diabetes as an inflammatory disease." *Nat Rev Immunol* **11**(2): 98-107.
- Donovan, J. L., C. Manach, L. Rios, C. Morand, A. Scalbert and C. Remesy (2002). "Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3." *Br J Nutr* **87**(4): 299-306.
- Dudhia, J. (2005). "Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage." *Cell Mol Life Sci* **62**(19-20): 2241-56.
- El, S. N. and S. Karakaya (2009). "Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health." *Nutr Rev* **67**(11): 632-8.
- Elliott, S., E. Hays, M. Mayor, M. Sporn and M. Vincenti (2003). "The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes." *Arthritis Res Ther* **5**(5): R285-91.
- Eng, E. T., J. Ye, D. Williams, S. Phung, R. E. Moore, M. K. Young, U. Gruntmanis, G. Braunstein and S. Chen (2003). "Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds." *Cancer Res* **63**(23): 8516-22.
- Evaniew, N., N. Simunovic and J. Karlsson (2014). "Cochrane in CORR(R): Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee." *Clin Orthop Relat Res* **472**(7): 2028-34.
- Eyre, D. (2002). "Collagen of articular cartilage." *Arthritis Res* **4**(1): 30-5.
- Eyre, D. R., Y. Matsui and J. J. Wu (2002). "Collagen polymorphisms of the intervertebral disc." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 844-8.
- Fabiani, R., R. Fucelli, F. Pieravanti, A. De Bartolomeo and G. Morozzi (2009). "Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells." *Mol Nutr Food Res* **53**(7): 887-96.
- Fabiani, R., P. Rosignoli, A. De Bartolomeo, R. Fucelli and G. Morozzi (2008). "Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells." *J Nutr* **138**(1): 42-8.
- Fabiani, R., M. V. Sepporta, P. Rosignoli, A. De Bartolomeo, M. Crescimanno and G. Morozzi (2012). "Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide." *Eur J Nutr* **51**(4): 455-64.
- Facchini, A., S. Cetrullo, S. D'Adamo, S. Guidotti, M. Minguzzi, R. M. Borzi and F. Flamigni (2014). "Hydroxytyrosol prevents increase of osteoarthritis markers in human chondrocytes treated with hydrogen peroxide or growth-related oncogene alpha." *PLoS One* **9**(10): e109724.

- Falagas, M. E., E. Zarkadoulia and P. I. Rafailidis (2009). "The therapeutic effect of balneotherapy: evaluation of the evidence from randomised controlled trials." *Int J Clin Pract* **63**(7): 1068-84.
- Fan, Z., B. Bau, H. Yang, S. Soeder and T. Aigner (2005). "Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta." *Arthritis Rheum* **52**(1): 136-43.
- Faria, A., C. Calhau, V. de Freitas and N. Mateus (2006). "Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators." *J Agric Food Chem* **54**(6): 2392-7.
- Felson, D. T. (2004). "Obesity and vocational and avocational overload of the joint as risk factors for osteoarthritis." *J Rheumatol Suppl* **70**: 2-5.
- Felson, D. T. (2009). "Developments in the clinical understanding of osteoarthritis." *Arthritis Res Ther* **11**(1): 203.
- Felson, D. T., J. Goggins, J. Niu, Y. Zhang and D. J. Hunter (2004). "The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment." *Arthritis Rheum* **50**(12): 3904-9.
- Felson, D. T., Y. Zhang, M. T. Hannan, A. Naimark, B. N. Weissman, P. Aliabadi and D. Levy (1995). "The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study." *Arthritis Rheum* **38**(10): 1500-5.
- Feringa, H. H., D. A. Laskey, J. E. Dickson and C. I. Coleman (2011). "The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: a meta-analysis of randomized controlled trials." *J Am Diet Assoc* **111**(8): 1173-81.
- Ferland, C. E., F. Beaudry and P. Vachon (2012). "Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model." *Phytother Res* **26**(9): 1278-85.
- Fermor, B., S. E. Christensen, I. Youn, J. M. Cernanec, C. M. Davies and J. B. Weinberg (2007). "Oxygen, nitric oxide and articular cartilage." *Eur Cell Mater* **13**: 56-65.
- Fernandes, L., K. B. Hagen, J. W. Bijlsma, O. Andreassen, P. Christensen, P. G. Conaghan, M. Doherty, R. Geenen, A. Hammond, I. Kjekens, L. S. Lohmander, H. Lund, C. D. Mallen, T. Nava, S. Oliver, K. Pavelka, I. Pitsillidou, J. A. da Silva, J. de la Torre, G. Zanolli and T. P. Vliet Vlieland (2012). "EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* **72**(7): 1125-35.
- Ferrieres, J. (2004). "The French paradox: lessons for other countries." *Heart* **90**(1): 107-11.
- Fidelix, T. S., C. R. Macedo, L. J. Maxwell and V. Fernandes Moca Trevisani (2014). "Diacerein for osteoarthritis." *Cochrane Database Syst Rev* **2**: CD005117.
- Filardo, G., H. Madry, M. Jelic, A. Roffi, M. Cucchiari and E. Kon (2013). "Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **21**(8): 1717-29.
- Finnson, K. W., Y. Chi, G. Bou-Gharios, A. Leask and A. Philip (2012). "TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis." *Front Biosci (Schol Ed)* **4**: 251-68.
- Frankel, E. N. (2011). "Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil." *J Agric Food Chem* **59**(3): 785-92.
- Frankel, E. N., J. Kanner, J. B. German, E. Parks and J. E. Kinsella (1993). "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine." *Lancet* **341**(8843): 454-7.
- Fransen, M., M. Agaliotis, L. Nairn, M. Votrubec, L. Bridgett, S. Su, S. Jan, L. March, J. Edmonds, R. Norton, M. Woodward and R. Day (2014). "Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens." *Ann Rheum Dis* **74**(5): 851-8.
- Gabay, O., D. J. Hall, F. Berenbaum, Y. Henrotin and C. Sanchez (2008). "Osteoarthritis and obesity: experimental models." *Joint Bone Spine* **75**(6): 675-9.
- Gaffen, J. D., S. J. Gleave, M. V. Crossman, M. T. Bayliss and R. M. Mason (1995). "Articular cartilage proteoglycans in osteoarthritic STR/Ort mice." *Osteoarthritis Cartilage* **3**(2): 95-104.
- Gelse, K., E. Poschl and T. Aigner (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(12): 1531-46.

- Georgiev, V., A. Ananga and V. Tsoleva (2014). "Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals." *Nutrients* **6**(1): 391-415.
- Gester, S., F. Wuest, B. Pawelke, R. Bergmann and J. Pietzsch (2005). "Synthesis and biodistribution of an 18F-labelled resveratrol derivative for small animal positron emission tomography." *Amino Acids* **29**(4): 415-28.
- Girkontaite, I., S. Frischholz, P. Lammi, K. Wagner, B. Swoboda, T. Aigner and K. Von der Mark (1996). "Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies." *Matrix Biol* **15**(4): 231-8.
- Glasson, S. S., R. Askew, B. Sheppard, B. Carito, T. Blanchet, H. L. Ma, C. R. Flannery, D. Peluso, K. Kanki, Z. Yang, M. K. Majumdar and E. A. Morris (2005). "Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis." *Nature* **434**(7033): 644-8.
- Glasson, S. S., T. J. Blanchet and E. A. Morris (2007). "The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse." *Osteoarthritis Cartilage* **15**(9): 1061-9.
- Goldring, M. B. (2000). "The role of the chondrocyte in osteoarthritis." *Arthritis Rheum* **43**(9): 1916-26.
- Goldring, M. B. (2002). "Molecular regulation of the chondrocyte phenotype." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**(6): 517-20.
- Goldring, M. B., J. Birkhead, L. J. Sandell, T. Kimura and S. M. Krane (1988). "Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes." *J Clin Invest* **82**(6): 2026-37.
- Goldring, M. B., M. Otero, K. Tsuchimochi, K. Ijiri and Y. Li (2008). "Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism." *Ann Rheum Dis* **67** Suppl 3: iii75-82.
- Goldwasser, M., T. Astley, M. van der Rest and F. H. Glorieux (1982). "Analysis of the type of collagen present in osteoarthritic human cartilage." *Clin Orthop Relat Res*(167): 296-302.
- Gonzalez-Abuin, N., M. Pinent, A. Casanova-Marti, L. Arola, M. Blay and A. Ardevol (2015). "Procyanidins and their healthy protective effects against type 2 diabetes." *Curr Med Chem* **22**(1): 39-50.
- Gonzalez-Correa, J. A., M. D. Navas, J. Munoz-Marin, M. Trujillo, J. Fernandez-Bolanos and J. P. de la Cruz (2008). "Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid." *J Agric Food Chem* **56**(17): 7872-6.
- Goodrich, K. M. and A. P. Neilson (2014). "Simultaneous UPLC-MS/MS analysis of native catechins and procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth inbred rats." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **958**: 63-74.
- Gorlach, S., W. Wagner, A. Podsedek, K. Szewczyk, M. Koziolkiewicz and J. Dastyk (2011). "Procyanidins from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit induce apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells in a degree of polymerization-dependent manner." *Nutr Cancer* **63**(8): 1348-60.
- Gosse, F., S. Roussi, S. Guyot, A. Schoenfelder, A. Mann, J. P. Bergerat, N. Seiler and F. Raul (2006). "Potentiation of apple procyanidin-triggered apoptosis by the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 in human colon cancer-derived metastatic cells." *Int J Oncol* **29**(2): 423-8.
- Goya, L., R. Mateos and L. Bravo (2007). "Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide." *Eur J Nutr* **46**(2): 70-8.
- Grahame, R. (2000). "Pain, distress and joint hyperlaxity." *Joint Bone Spine* **67**(3): 157-63.
- Granados-Principal, S., J. L. Quiles, C. Ramirez-Tortosa, P. Camacho-Corencia, P. Sanchez-Rovira, L. Vera-Ramirez and M. C. Ramirez-Tortosa (2011). "Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours." *Mol Nutr Food Res* **55** Suppl 1: S117-26.
- Gregory, M. H., N. Capito, K. Kuroki, A. M. Stoker, J. L. Cook and S. L. Sherman (2012). "A review of translational animal models for knee osteoarthritis." *Arthritis* **2012**: 764621.

- Grignaffini, P., P. Roma, C. Galli and A. L. Catapano (1994). "Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol." *Lancet* **343**(8908): 1296-7.
- Guerne, P. A., B. L. Zuraw, J. H. Vaughan, D. A. Carson and M. Lotz (1989). "Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis." *J Clin Invest* **83**(2): 585-92.
- Hall, K. B. (2015). *Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*, Academic Press.
- Halliwell, B., K. Zhao and M. Whiteman (2000). "The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?" *Free Radic Res* **33**(6): 819-30.
- Hamden, K., S. Carreau, M. A. Boujbiha, S. Lajmi, D. Aloulou, D. Kchaou and A. Elfeki (2008). "Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 beta-estradiol." *Steroids* **73**(5): 495-501.
- Han, J., T. P. Talorete, P. Yamada and H. Isoda (2009). "Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells." *Cytotechnology* **59**(1): 45-53.
- Hangody, L. and P. Fules (2003). "Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience." *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 2**: 25-32.
- Haq, I., E. Murphy and J. Dacre (2003). "Osteoarthritis." *Postgrad Med J* **79**(933): 377-83.
- Hardin, J. A., N. Cobelli and L. Santambrogio (2015). "Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue." *Nat Rev Rheumatol*.
- Harzy, T., N. Ghani, N. Akasbi, W. Bono and C. Nejari (2009). "Short- and long-term therapeutic effects of thermal mineral waters in knee osteoarthritis: a systematic review of randomized controlled trials." *Clin Rheumatol* **28**(5): 501-7.
- Haseeb, A., D. Chen and T. M. Haqqi (2013). "Delphinidin inhibits IL-1beta-induced activation of NF-kappaB by modulating the phosphorylation of IRAK-1(Ser376) in human articular chondrocytes." *Rheumatology (Oxford)* **52**(6): 998-1008.
- Hashim, Y. Z., I. R. Rowland, H. McGlynn, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto, G. Montedoro, L. Kaisalo, K. Wahala and C. I. Gill (2008). "Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro." *Int J Cancer* **122**(3): 495-500.
- Hashmi, M. A., A. Khan, M. Hanif, U. Farooq and S. Perveen (2015). "Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of Olea europaea (Olive)." *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**: 541591.
- Hata, A. N. and R. M. Breyer (2004). "Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation." *Pharmacol Ther* **103**(2): 147-66.
- Henrotin, Y., M. Gharbi, G. Mazzucchelli, J. E. Dubuc, E. De Pauw and M. Deberg (2012). "Fibulin 3 peptides Fib3-1 and Fib3-2 are potential biomarkers of osteoarthritis." *Arthritis Rheum* **64**(7): 2260-7.
- Henrotin, Y., C. Lambert, D. Couchourel, C. Ripoll and E. Chiotelli (2011). "Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products." *Osteoarthritis Cartilage* **19**(1): 1-21.
- Henrotin, Y., M. Marty and A. Mobasheri (2014). "What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis?" *Maturitas* **78**(3): 184-7.
- Henrotin, Y., A. Mobasheri and M. Marty (2012). "Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis?" *Arthritis Res Ther* **14**(1): 201.
- Henrotin, Y. E., P. Bruckner and J. P. Pujol (2003). "The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* **11**(10): 747-55.
- Hernandez-Jimenez, A., E. Gomez-Plaza, A. Martinez-Cutillas and J. A. Kennedy (2009). "Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes." *J Agric Food Chem* **57**(22): 10798-803.
- Hochberg, M. C., R. D. Altman, K. T. April, M. Benkhalti, G. Guyatt, J. McGowan, T. Towheed, V. Welch, G. Wells and P. Tugwell (2012). "American College of Rheumatology 2012

- recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee." *Arthritis Care Res (Hoboken)* **64**(4): 465-74.
- Hochberg, M. C. and M. Dougados (2001). "Pharmacological therapy of osteoarthritis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **15**(4): 583-93.
- Holt, R. R., S. A. Lazarus, M. C. Sullards, Q. Y. Zhu, D. D. Schramm, J. F. Hammerstone, C. G. Fraga, H. H. Schmitz and C. L. Keen (2002). "Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa." *Am J Clin Nutr* **76**(4): 798-804.
- Horcajada, M. N., C. Sanchez, F. Membrez Scalfio, P. Drion, F. Comblain, S. Taralla, A. F. Donneau, E. A. Offord and Y. Henrotin (2015). "Oleuropein or rutin consumption decreases the spontaneous development of osteoarthritis in the Hartley guinea pig." *Osteoarthritis Cartilage* **23**(1): 94-102.
- Hu, T., X. W. He, J. G. Jiang and X. L. Xu (2014). "Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects." *J Agric Food Chem* **62**(7): 1449-55.
- Huang, K., J. P. Bao, G. J. Jennings and L. D. Wu (2015). "The disease-modifying effect of dehydroepiandrosterone in different stages of experimentally induced osteoarthritis: a histomorphometric study." *BMC Musculoskelet Disord* **16**: 178.
- Huber, M., S. Trattnig and F. Lintner (2000). "Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage." *Invest Radiol* **35**(10): 573-80.
- Huebner, J. L., J. M. Williams, M. Deberg, Y. Henrotin and V. B. Kraus (2010). "Collagen fibril disruption occurs early in primary guinea pig knee osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **18**(3): 397-405.
- Hui, A. Y., W. J. McCarty, K. Masuda, G. S. Firestein and R. L. Sah (2011). "A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**(1): 15-37.
- Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." *Osteoarthritis Cartilage* **10**(6): 432-63.
- Ichimura, S., J. J. Wu and D. R. Eyre (2000). "Two-dimensional peptide mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage." *Arch Biochem Biophys* **378**(1): 33-9.
- Inoue, K., K. Masuko-Hongo, M. Okamoto and K. Nishioka (2005). "Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes." *Rheumatol Int* **26**(2): 93-8.
- Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* **67**: 609-52.
- Ishikawa, G., Y. Koya, H. Tanaka and Y. Nagakura (2015). "Long-term analgesic effect of a single dose of anti-NGF antibody on pain during motion without notable suppression of joint edema and lesion in a rat model of osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **23**(6): 925-32.
- Iwanaga, T., M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase and K. Nozawa-Inoue (2000). "Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint." *Arch Histol Cytol* **63**(1): 17-31.
- Jeffrey, J. E. and R. M. Aspden (2007). "Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro." *Arthritis Res Ther* **9**(6): R129.
- Jeffrey, K. L., M. Camps, C. Rommel and C. R. Mackay (2007). "Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses." *Nat Rev Drug Discov* **6**(5): 391-403.
- Jimenez, J. P., J. Serrano, M. Tabernero, S. Arranz, M. E. Diaz-Rubio, L. Garcia-Diz, I. Goni and F. Saura-Calixto (2008). "Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors." *Nutrition* **24**(7-8): 646-53.
- Jones, A., P. G. Silva, A. C. Silva, M. Colucci, A. Tuffanin, J. R. Jardim and J. Natour (2012). "Impact of cane use on pain, function, general health and energy expenditure during gait in patients with knee osteoarthritis: a randomised controlled trial." *Ann Rheum Dis* **71**(2): 172-9.

- Jordan, K. M., N. K. Arden, M. Doherty, B. Bannwarth, J. W. Bijlsma, P. Dieppe, K. Gunther, H. Hauselmann, G. Herrero-Beaumont, P. Kaklamanis, S. Lohmander, B. Leeb, M. Lequesne, B. Mazieres, E. Martin-Mola, K. Pavelka, A. Pendleton, L. Punzi, U. Serni, B. Swoboda, G. Verbruggen, I. Zimmerman-Gorska and M. Dougados (2003). "EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)." *Ann Rheum Dis* **62**(12): 1145-55.
- Jost, P. J. and J. Ruland (2007). "Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications." *Blood* **109**(7): 2700-7.
- Kalra, E. K. (2003). "Nutraceutical--definition and introduction." *AAPS PharmSci* **5**(3): E25.
- Kapoor, M., J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J. P. Pelletier and H. Fahmi (2011). "Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis." *Nat Rev Rheumatol* **7**(1): 33-42.
- Karsenty, G. and F. Oury (2014). "Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin." *Mol Cell Endocrinol* **382**(1): 521-6.
- Kellgren, J. H. and J. S. Lawrence (1957). "Radiological assessment of osteo-arthritis." *Ann Rheum Dis* **16**(4): 494-502.
- Kelwick, R., I. Desanlis, G. N. Wheeler and D. R. Edwards (2015). "The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family." *Genome Biol* **16**(1): 113.
- Khanna, D., G. Sethi, K. S. Ahn, M. K. Pandey, A. B. Kunnunakkara, B. Sung, A. Aggarwal and B. B. Aggarwal (2007). "Natural products as a gold mine for arthritis treatment." *Curr Opin Pharmacol* **7**(3): 344-51.
- Kijima, I., S. Phung, G. Hur, S. L. Kwok and S. Chen (2006). "Grape seed extract is an aromatase inhibitor and a suppressor of aromatase expression." *Cancer Res* **66**(11): 5960-7.
- Killian, M. L., D. I. Isaac, R. C. Haut, L. M. Dejardin, D. Leetun and T. L. Donahue (2010). "Traumatic anterior cruciate ligament tear and its implications on meniscal degradation: a preliminary novel lapine osteoarthritis model." *J Surg Res* **164**(2): 234-41.
- Kim, J. H., J. Jeon, M. Shin, Y. Won, M. Lee, J. S. Kwak, G. Lee, J. Rhee, J. H. Ryu, C. H. Chun and J. S. Chun (2014). "Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis." *Cell* **156**(4): 730-43.
- Klurfeld, D. M. and D. Kritchevsky (1981). "Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits." *Experimental and molecular pathology* **34**(1): 62-71.
- Knauper, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight and G. Murphy (1996). "Biochemical characterization of human collagenase-3." *J Biol Chem* **271**(3): 1544-50.
- Knudson, C. B. and W. Knudson (2001). "Cartilage proteoglycans." *Semin Cell Dev Biol* **12**(2): 69-78.
- Kobayashi, M., G. R. Squires, A. Mousa, M. Tanzer, D. J. Zukor, J. Antoniou, U. Feige and A. R. Poole (2005). "Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage." *Arthritis Rheum* **52**(1): 128-35.
- Kozikowski, A. P., W. Tuckmantel, G. Bottcher and L. J. Romanczyk, Jr. (2003). "Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4.(1) Synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4beta,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest." *J Org Chem* **68**(5): 1641-58.
- Kraus, V. B., F. J. Blanco, M. Englund, M. A. Karsdal and L. S. Lohmander (2015). "Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use." *Osteoarthritis Cartilage* **23**(8): 1233-41.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." *Science* **260**(5110): 920-6.
- Larsen, W., G. Schoenwolf, S. Bleyl, P. Brauer and P. Francis-West (2011). *Embryologie humaine*, De Boeck Supérieur.
- Le Gros Clark, W. E. (1965). *The Tissues of the Body: An Introduction to the Study of Anatomy*. Oxford, Clarendon Press.
- Le Pen, C., C. Reygobellet and I. Gerentes (2005). "Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study." *Joint Bone Spine* **72**(6): 567-70.

- Lecour, S. and K. T. Lamont (2011). "Natural polyphenols and cardioprotection." Mini Rev Med Chem **11**(14): 1191-9.
- Lederer, E. (2014). "Regulation of serum phosphate." J Physiol **592**(Pt 18): 3985-95.
- Lee, N. K., H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J. D. Ahn, C. Confavreux, R. Dacquin, P. J. Mee, M. D. McKee, D. Y. Jung, Z. Zhang, J. K. Kim, F. Mauvais-Jarvis, P. Ducy and G. Karsenty (2007). "Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton." Cell **130**(3): 456-69.
- Lefebvre, V., C. Peeters-Joris and G. Vaes (1990). "Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes." Biochim Biophys Acta **1052**(3): 366-78.
- Lewandowska, U., K. Szewczyk, K. Owczarek, Z. Hrabec, A. Podsedek, D. Sosnowska and E. Hrabec (2013). "Procyanidins from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit invasiveness of breast cancer cells and modulate the expression of selected genes involved in angiogenesis, metastasis, and apoptosis." Nutr Cancer **65**(8): 1219-31.
- Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." Nature **473**(7347): 317-25.
- Linn, S., B. Murtaugh and E. Casey (2012). "Role of sex hormones in the development of osteoarthritis." PM R **4**(5 Suppl): S169-73.
- Little, C. B., A. Barai, D. Burkhardt, S. M. Smith, A. J. Fosang, Z. Werb, M. Shah and E. W. Thompson (2009). "Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development." Arthritis Rheum **60**(12): 3723-33.
- Little, C. B. and M. M. Smith (2008). "Animal models of osteoarthritis." Current rheumatology reviews **4**(3).
- Liu, W., N. Burton-Wurster, T. T. Glant, S. Tashman, D. R. Sumner, R. V. Kamath, G. Lust, J. H. Kimura and G. Cs-Szabo (2003). "Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels." J Orthop Res **21**(4): 730-7.
- Lopez-Armada, M. J., B. Carames, M. Lires-Dean, B. Cillero-Pastor, C. Ruiz-Romero, F. Galdo and F. J. Blanco (2006). "Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **14**(7): 660-9.
- Lotz, M. (1999). "The role of nitric oxide in articular cartilage damage." Rheum Dis Clin North Am **25**(2): 269-82.
- Luo, C., Y. Li, H. Wang, Y. Cui, Z. Feng, H. Li, Y. Wang, K. Wurtz, P. Weber, J. Long and J. Liu (2013). "Hydroxytyrosol promotes superoxide production and defects in autophagy leading to anti-proliferation and apoptosis on human prostate cancer cells." Curr Cancer Drug Targets **13**(6): 625-39.
- Ly, C., J. Yockell-Lelievre, Z. M. Ferraro, J. T. Arnason, J. Ferrier and A. Gruslin (2015). "The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development." Hum Reprod Update **21**(2): 228-48.
- Magi, M., A. Branca, C. Bucca and V. Langerame (1991). "Hoffa disease." Ital J Orthop Traumatol **17**(2): 211-6.
- Maheu, E., C. Cadet, M. Marty, D. Moyse, I. Kerloch, P. Coste, M. Dougados, B. Mazieres, T. D. Spector, H. Halhol, J. M. Grouin and M. Lequesne (2014). "Randomised, controlled trial of avocado-soybean unsaponifiable (Piascledine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study." Ann Rheum Dis **73**(2): 376-84.
- Maheu, E., B. Mazieres, J. P. Valat, G. Loyau, X. Le Loet, P. Bourgeois, J. M. Grouin and S. Rozenberg (1998). "Symptomatic efficacy of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial with a six-month treatment period and a two-month followup demonstrating a persistent effect." Arthritis Rheum **41**(1): 81-91.

- Makela, J. T., S. K. Han, W. Herzog and R. K. Korhonen (2015). "Very early osteoarthritis changes sensitively fluid flow properties of articular cartilage." *J Biomech.*
- Makris, D. P., G. Boskou, N. K. Andrikopoulos and P. Kefalas (2008). "Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry." *European Food Research and Technology* **226**(5): 1075-1079.
- Mallein-Gerin, F., F. Ruggiero, T. M. Quinn, F. Bard, A. J. Grodzinsky, B. R. Olsen and M. van der Rest (1995). "Analysis of collagen synthesis and assembly in culture by immortalized mouse chondrocytes in the presence or absence of alpha 1(IX) collagen chains." *Exp Cell Res* **219**(1): 257-65.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am J Clin Nutr* **79**(5): 727-47.
- Mankin, H. J., H. Dorfman, L. Lippiello and A. Zarins (1971). "Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data." *J Bone Joint Surg Am* **53**(3): 523-37.
- Manna, C., P. Galletti, V. Cucciolla, O. Molledo, A. Leone and V. Zappia (1997). "The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells." *J Nutr* **127**(2): 286-92.
- Manolagas, S. C. (2000). "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis." *Endocr Rev* **21**(2): 115-37.
- Marijnissen, A. C., P. M. van Roermund, N. Verzijl, J. M. Tekoppele, J. W. Bijlsma and F. P. Lafeber (2002). "Steady progression of osteoarthritic features in the canine groove model." *Osteoarthritis Cartilage* **10**(4): 282-9.
- Marin, L., E. M. Miguez, C. J. Villar and F. Lombo (2015). "Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties." *Biomed Res Int* **2015**: 905215.
- Marsilio, V., C. Campestre and B. Lanza (2001). "Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing." *Food Chemistry* **74**(1): 55-60.
- Martel-Pelletier, J., N. Alaaeddine and J. P. Pelletier (1999). "Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis." *Front Biosci* **4**: D694-703.
- Martel-Pelletier, J., J. P. Pelletier and H. Fahmi (2003). "Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues." *Semin Arthritis Rheum* **33**(3): 155-67.
- Martel-Pelletier, J., C. Roubille, F. Abram, M. C. Hochberg, M. Dorais, P. Delorme, J. P. Raynauld and J. P. Pelletier (2015). "First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort." *Ann Rheum Dis* **74**(3): 547-56.
- Martin-Millan, M. and S. Castaneda (2013). "Estrogens, osteoarthritis and inflammation." *Joint Bone Spine* **80**(4): 368-73.
- Martinez-Valverde, I., M. J. Periago and G. Ros (2000). "[Nutritional importance of phenolic compounds in the diet]." *Arch Latinoam Nutr* **50**(1): 5-18.
- Mason, R. M., M. G. Chambers, J. Flannelly, J. D. Gaffen, J. Dudhia and M. T. Bayliss (2001). "The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **9**(2): 85-91.
- Mateos-Martin, M. L., J. Perez-Jimenez, E. Fuguet and J. L. Torres (2012). "Non-extractable proanthocyanidins from grapes are a source of bioavailable (epi)catechin and derived metabolites in rats." *Br J Nutr* **108**(2): 290-7.
- Matta, C. and R. Zakany (2013). "Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair." *Front Biosci (Schol Ed)* **5**: 305-24.
- Matthews, J. A., G. E. Wnek, D. G. Simpson and G. L. Bowlin (2002). "Electrospinning of collagen nanofibers." *Biomacromolecules* **3**(2): 232-8.
- Maxwell, S., A. Cruickshank and G. Thorpe (1994). "Red wine and antioxidant activity in serum." *Lancet* **344**(8916): 193-4.
- McAlindon, T. E., R. R. Bannuru, M. C. Sullivan, N. K. Arden, F. Berenbaum, S. M. Bierma-Zeinstra, G. A. Hawker, Y. Henrotin, D. J. Hunter, H. Kawaguchi, K. Kwok, S. Lohmander, F. Rannou, E. M.

- Roos and M. Underwood (2014). "OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **22**(3): 363-88.
- McAlindon, T. E., D. T. Felson, Y. Zhang, M. T. Hannan, P. Aliabadi, B. Weissman, D. Rush, P. W. Wilson and P. Jacques (1996). "Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study." *Ann Intern Med* **125**(5): 353-9.
- Meisinger, C., J. Baumert, N. Khuseynova, H. Loewel and W. Koenig (2005). "Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population." *Circulation* **112**(5): 651-7.
- Mével, E., L. E. Monfoulet, C. Merceron, V. Coxam, Y. Wittrant, L. Beck and J. Guicheux (2014). "Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools." *Drug Discov Today* **19**(10): 1649-1658.
- Miro-Casas, E., M. I. Covas, M. Farre, M. Fito, J. Ortuno, T. Weinbrenner, P. Roset and R. de la Torre (2003). "Hydroxytyrosol disposition in humans." *Clin Chem* **49**(6 Pt 1): 945-52.
- Miwa, M., R. Saura, S. Hirata, Y. Hayashi, K. Mizuno and H. Itoh (2000). "Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway." *Osteoarthritis Cartilage* **8**(1): 17-24.
- Mobasher, A., C. A. Bondy, K. Moley, A. F. Mendes, S. C. Rosa, S. M. Richardson, J. A. Hoyland, R. Barrett-Jolley and M. Shakibaei (2008). "Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and pro-inflammatory cytokines." *Adv Anat Embryol Cell Biol* **200**: 1 p following vi, 1-84.
- Moodie, J. P., K. S. Stok, R. Muller, T. L. Vincent and S. J. Shefelbine (2011). "Multimodal imaging demonstrates concomitant changes in bone and cartilage after destabilisation of the medial meniscus and increased joint laxity." *Osteoarthritis Cartilage* **19**(2): 163-70.
- Moreland, L. W. (2003). "Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action." *Arthritis Res Ther* **5**(2): 54-67.
- Mouw, J. K., G. Ou and V. M. Weaver (2014). "Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(12): 771-85.
- Muir, H. (1995). "The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules." *Bioessays* **17**(12): 1039-48.
- Mullen, W., B. A. Graf, S. T. Caldwell, R. C. Hartley, G. G. Duthie, C. A. Edwards, M. E. Lean and A. Crozier (2002). "Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside." *J Agric Food Chem* **50**(23): 6902-9.
- Muramatsu, Y., T. Sasho, M. Saito, S. Yamaguchi, R. Akagi, S. Mukoyama, Y. Akatsu, J. Katsuragi, T. Fukawa, J. Endo, H. Hoshi, Y. Yamamoto and K. Takahashi (2014). "Preventive effects of hyaluronan from deterioration of gait parameters in surgically induced mice osteoarthritic knee model." *Osteoarthritis Cartilage* **22**(6): 831-5.
- Murrell, G. A., D. Jang and R. J. Williams (1995). "Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage." *Biochem Biophys Res Commun* **206**(1): 15-21.
- Naumann, A., J. E. Dennis, A. Awadallah, D. A. Carrino, J. M. Mansour, E. Kastenbauer and A. I. Caplan (2002). "Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit." *J Histochem Cytochem* **50**(8): 1049-58.
- Neame, P. J., H. Tapp and A. Azizan (1999). "Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage." *Cell Mol Life Sci* **55**(10): 1327-40.
- Nelson, A. E., K. D. Allen, Y. M. Golightly, A. P. Goode and J. M. Jordan (2014). "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* **43**(6): 701-12.

- Nietfeld, J. J., B. Wilbrink, M. Helle, J. L. van Roy, W. den Otter, A. J. Swaak and O. Huber-Bruning (1990). "Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage." *Arthritis Rheum* **33**(11): 1695-701.
- Nomoto, H., M. Iigo, H. Hamada, S. Kojima and H. Tsuda (2004). "Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis." *Nutr Cancer* **49**(1): 81-8.
- Notarnicola, M., S. Pisanti, V. Tutino, D. Bocale, M. T. Rotelli, A. Gentile, V. Memeo, M. Bifulco, E. Perri and M. G. Caruso (2011). "Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells." *Genes Nutr* **6**(1): 63-9.
- Nousis, L., P. T. Doulias, N. Aligiannis, D. Bazios, A. Agalias, D. Galaris and S. Mitakou (2005). "DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide." *Free Radic Res* **39**(7): 787-95.
- Oliveria, S. A., D. T. Felson, J. I. Reed, P. A. Cirillo and A. M. Walker (1995). "Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization." *Arthritis Rheum* **38**(8): 1134-41.
- Orimo, H. (2010). "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease." *J Nippon Med Sch* **77**(1): 4-12.
- Osman, H. E., N. Maalej, D. Shanmuganayagam and J. D. Folts (1998). "Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys." *J Nutr* **128**(12): 2307-12.
- Oury, F., G. Sumara, O. Sumara, M. Ferron, H. Chang, C. E. Smith, L. Hermo, S. Suarez, B. L. Roth, P. Ducy and G. Karsenty (2011). "Endocrine regulation of male fertility by the skeleton." *Cell* **144**(5): 796-809.
- Packer, L., G. Rimbach and F. Virgili (1999). "Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol." *Free Radic Biol Med* **27**(5-6): 704-24.
- Parfitt, A. M., G. R. Mundy, G. D. Roodman, D. E. Hughes and B. F. Boyce (1996). "A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates." *J Bone Miner Res* **11**(2): 150-9.
- Pasinetti, G. M., H. Ksiezak-Reding, I. Santa-Maria, J. Wang and L. Ho (2010). "Development of a grape seed polyphenolic extract with anti-oligomeric activity as a novel treatment in progressive supranuclear palsy and other tauopathies." *J Neurochem* **114**(6): 1557-68.
- Pastrana-Bonilla, E., C. C. Akoh, S. Sellappan and G. Krewer (2003). "Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes." *J Agric Food Chem* **51**(18): 5497-503.
- Pavelka, K., P. Coste, P. Geher and G. Krejci (2010). "Efficacy and safety of piascledine 300 versus chondroitin sulfate in a 6 months treatment plus 2 months observation in patients with osteoarthritis of the knee." *Clin Rheumatol* **29**(6): 659-70.
- Pelletier, J. P., C. Boileau, J. Brunet, M. Boily, D. Lajeunesse, P. Reboul, S. Laufer and J. Martel-Pelletier (2004). "The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K." *Bone* **34**(3): 527-38.
- Peng, C., X. Wang, J. Chen, R. Jiao, L. Wang, Y. M. Li, Y. Zuo, Y. Liu, L. Lei, K. Y. Ma, Y. Huang and Z. Y. Chen (2014). "Biology of ageing and role of dietary antioxidants." *Biomed Res Int* **2014**: 831841.
- Peterson, D. W., R. C. George, F. Scaramozzino, N. E. LaPointe, R. A. Anderson, D. J. Graves and J. Lew (2009). "Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with Alzheimer's disease in vitro." *J Alzheimers Dis* **17**(3): 585-97.
- Peterson, L., H. S. Vasiliadis, M. Brittberg and A. Lindahl (2010). "Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up." *Am J Sports Med* **38**(6): 1117-24.
- Petroni, A., M. Blasevich, M. Salami, N. Papini, G. F. Montedoro and C. Galli (1995). "Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil." *Thromb Res* **78**(2): 151-60.

- Pfander, D., N. Heinz, P. Rothe, H. D. Carl and B. Swoboda (2004). "Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1beta: a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* **63**(3): 240-4.
- Philipps, C. R. and R. D. Brasington (2010). "Osteoarthritis treatment update: Are NSAIDs still in the picture?" *The Journal of Musculoskeletal Medicine* **27**(2): 1-8.
- Phitak, T., P. Pothacharoen, J. Settakorn, W. Poompimol, B. Catterson and P. Kongtawelert (2012). "Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin." *Phytochemistry* **80**: 77-88.
- Poole, A. R. (1986). "Proteoglycans in health and disease: structures and functions." *Biochemical Journal* **236**(1): 1.
- Poole, A. R., M. Kobayashi, T. Yasuda, S. Laverty, F. Mwale, T. Kojima, T. Sakai, C. Wahl, S. El-Maadawy, G. Webb, E. Tchetina and W. Wu (2002). "Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**: ii78-81.
- Poole, C. A. (1997). "Articular cartilage chondrons: form, function and failure." *J Anat* **191 (Pt 1)**: 1-13.
- Poole, C. A., M. H. Flint and B. W. Beaumont (1987). "Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages." *J Orthop Res* **5**(4): 509-22.
- Porter, S., I. M. Clark, L. Kevorkian and D. R. Edwards (2005). "The ADAMTS metalloproteinases." *Biochem J* **386**(Pt 1): 15-27.
- Posey, K. L. and J. T. Hecht (2008). "The role of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in skeletal disease." *Curr Drug Targets* **9**(10): 869-77.
- Pottie, P., N. Presle, B. Terlain, P. Netter, D. Mainard and F. Berenbaum (2006). "Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted!" *Ann Rheum Dis* **65**(11): 1403-5.
- Pritzker, K. P., S. Gay, S. A. Jimenez, K. Ostergaard, J. P. Pelletier, P. A. Revell, D. Salter and W. B. van den Berg (2005). "Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging." *Osteoarthritis Cartilage* **14**(1): 13-29.
- Raja, K. and N. Dewan (2011). "Efficacy of knee braces and foot orthoses in conservative management of knee osteoarthritis: a systematic review." *Am J Phys Med Rehabil* **90**(3): 247-62.
- Ramljak, D., L. J. Romanczyk, L. J. Metheny-Barlow, N. Thompson, V. Knezevic, M. Galperin, A. Ramesh and R. B. Dickson (2005). "Pentameric procyanidin from Theobroma cacao selectively inhibits growth of human breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* **4**(4): 537-46.
- Rannou, F., J. Sellam and F. Berenbaum (2010). "Pathophysiology of osteoarthritis: updated concepts." *Presse Med* **39**(11): 1159-63.
- Rannou, F., J. Sellam and F. Berenbaum (2010). "[Pathophysiology of osteoarthritis: updated concepts]." *Presse Med* **39**(11): 1159-63.
- Reboul, P., J. P. Pelletier, G. Tardif, J. M. Cloutier and J. Martel-Pelletier (1996). "The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis." *J Clin Invest* **97**(9): 2011-9.
- Reginster, J. Y., C. Cooper, M. Hochberg, J. P. Pelletier, R. Rizzoli, J. Kanis, E. Abadie, E. Maheu, M. L. Brandi, J. P. Devogelaer, J. Branco, G. Herrero-Beaumont, P. D'Hooghe and O. Bruyere (2015). "Comments on the discordant recommendations for the use of symptomatic slow-acting drugs in knee osteoarthritis." *Curr Med Res Opin* **31**(5): 1041-5.
- Revilla, E. and J. M. Ryan (2000). "Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation." *J Chromatogr A* **881**(1-2): 461-9.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radic Biol Med* **20**(7): 933-56.
- Richette, P., A. Latourte and A. Frazier (2015). "Safety and efficacy of paracetamol and NSAIDs in osteoarthritis: which drug to recommend?" *Expert Opin Drug Saf* **14**(8): 1259-68.
- Rietjens, S. J., A. Bast and G. R. Haenen (2007). "New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol." *J Agric Food Chem* **55**(18): 7609-14.

- Rintelen, B., K. Neumann and B. F. Leeb (2006). "A meta-analysis of controlled clinical studies with diacerein in the treatment of osteoarthritis." *Arch Intern Med* **166**(17): 1899-906.
- Rong, Y., L. Li, V. Shah and B. H. Lau (1994). "Pycnogenol protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury." *Biotechnol Ther* **5**(3-4): 117-26.
- Ronziere, M. C., S. Ricard-Blum, J. Tiollier, D. J. Hartmann, R. Garrone and D. Herbage (1990). "Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen." *Biochim Biophys Acta* **1038**(2): 222-30.
- Ropes, M. W., G. A. Bennett and W. Bauer (1939). "The Origin and Nature of Normal Synovial Fluid." *J Clin Invest* **18**(3): 351-72.
- Ropes, M. W., E. C. Rossmeisl and W. Bauer (1940). "The Origin and Nature of Normal Human Synovial Fluid." *J Clin Invest* **19**(6): 795-9.
- Rossell, J. (2001). *Frying: improving quality*, Woodhead Publishing.
- Roughley, P. J. (2006). "The structure and function of cartilage proteoglycans." *Eur Cell Mater* **12**: 92-101.
- Roughley, P. J. and E. R. Lee (1994). "Cartilage proteoglycans: structure and potential functions." *Microsc Res Tech* **28**(5): 385-97.
- Ruano, J., J. Lopez-Miranda, F. Fuentes, J. A. Moreno, C. Bellido, P. Perez-Martinez, A. Lozano, P. Gomez, Y. Jimenez and F. Perez Jimenez (2005). "Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients." *J Am Coll Cardiol* **46**(10): 1864-8.
- Rubio-Senent, F., B. de Roos, G. Duthie, J. Fernandez-Bolanos and G. Rodriguez-Gutierrez (2014). "Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats." *Eur J Nutr*.
- Rubio, L., A. Macia, R. M. Valls, A. Pedret, M. P. Romero, R. Sola and M. J. Motilva (2012). "A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: hydroxytyrosol acetate sulphate." *Food Chem* **134**(2): 1132-6.
- Ruf, J. C., J. L. Berger and S. Renaud (1995). "Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats. Relation to tannins and lipid peroxidation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(1): 140-4.
- Ryan, D. and K. Robards (1998). "Critical Review. Phenolic compounds in olives." *Analyst* **123**(5): 31R-44R.
- Saklatvala, J. (1986). "Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage." *Nature* **322**(6079): 547-9.
- Salami, M., C. Galli, L. De Angelis and F. Visioli (1995). "Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol." *Pharmacol Res* **31**(5): 275-9.
- Samuels, J., S. Krasnokutsky and S. B. Abramson (2008). "Osteoarthritis: a tale of three tissues." *Bull NYU Hosp Jt Dis* **66**(3): 244-50.
- Sandell, L. J., N. Morris, J. R. Robbins and M. B. Goldring (1991). "Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide." *J Cell Biol* **114**(6): 1307-19.
- Sapolsky, A. I., R. D. Altman, J. F. Woessner and D. S. Howell (1973). "The action of cathepsin D in human articular cartilage on proteoglycans." *J Clin Invest* **52**(3): 624-33.
- Sawitzke, A. D., H. Shi, M. F. Finco, D. D. Dunlop, C. L. Harris, N. G. Singer, J. D. Bradley, D. Silver, C. G. Jackson, N. E. Lane, C. V. Oddis, F. Wolfe, J. Lisse, D. E. Furst, C. O. Bingham, D. J. Reda, R. W. Moskowitz, H. J. Williams and D. O. Clegg (2010). "Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT." *Ann Rheum Dis* **69**(8): 1459-64.
- Saxer, R. A., S. J. Bent, B. D. Brower-Toland, Z. Mi, P. D. Robbins, C. H. Evans and A. J. Nixon (2001). "Gene mediated insulin-like growth factor-I delivery to the synovium." *J Orthop Res* **19**(5): 759-67.

- Scalbert, A., C. Morand, C. Manach and C. Remesy (2002). "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health." *Biomed Pharmacother* **56**(6): 276-82.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." *J Nutr* **130**(8S Suppl): 2073S-85S.
- Schmidt, M. B., E. H. Chen and S. E. Lynch (2006). "A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair." *Osteoarthritis Cartilage* **14**(5): 403-12.
- Schmitt, C. A., N. Handler, E. H. Heiss, T. Erker and V. M. Dirsch (2007). "No evidence for modulation of endothelial nitric oxide synthase by the olive oil polyphenol hydroxytyrosol in human endothelial cells." *Atherosclerosis* **195**(1): e58-64.
- Schunke, M., B. Tillmann, M. Bruck and W. Muller-Ruchholtz (1988). "Morphologic characteristics of developing osteoarthrotic lesions in the knee cartilage of STR/IN mice." *Arthritis Rheum* **31**(7): 898-905.
- Serafini, M., G. Maiani and A. Ferro-Luzzi (1998). "Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans." *J Nutr* **128**(6): 1003-7.
- Serra, A., A. Macia, M. P. Romero, C. Pinol and M. J. Motilva (2011). "Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**(19): 1519-28.
- Serra, A., A. Macia, L. Rubio, N. Angles, N. Ortega, J. R. Morello, M. P. Romero and M. J. Motilva (2013). "Distribution of procyanidins and their metabolites in rat plasma and tissues in relation to ingestion of procyanidin-enriched or procyanidin-rich cocoa creams." *Eur J Nutr* **52**(3): 1029-38.
- Serra, A., L. Rubio, X. Borrás, A. Macia, M. P. Romero and M. J. Motilva (2012). "Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake." *Mol Nutr Food Res* **56**(3): 486-96.
- Shafiee, M., M. A. Carbonneau, N. Urban, B. Descomps and C. L. Leger (2003). "Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds." *Free Radic Res* **37**(5): 573-84.
- Shakibaei, M., C. Csaki, S. Nebrich and A. Mobasheri (2008). "Resveratrol suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis." *Biochem Pharmacol* **76**(11): 1426-39.
- Shang, X. J., G. Yao, J. P. Ge, Y. Sun, W. H. Teng and Y. F. Huang (2009). "Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner." *J Androl* **30**(2): 122-6.
- Sherman, G., L. Zeller, A. Avriel, M. Friger, M. Harari and S. Sukenik (2009). "Intermittent balneotherapy at the Dead Sea area for patients with knee osteoarthritis." *Isr Med Assoc J* **11**(2): 88-93.
- Shilpi, A., S. Parbin, D. Sengupta, S. Kar, M. Deb, S. K. Rath, N. Pradhan, M. Rakshit and S. K. Patra (2015). "Mechanisms of DNA methyltransferase-inhibitor interactions: Procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer." *Chem Biol Interact* **233**: 122-38.
- Shoji, T., S. Masumoto, N. Moriichi, M. Kobori, T. Kanda, H. Shinmoto and T. Tsushida (2005). "Procyanidin trimers to pentamers fractionated from apple inhibit melanogenesis in B16 mouse melanoma cells." *J Agric Food Chem* **53**(15): 6105-11.
- Singh, R. P., A. K. Tyagi, S. Dhanalakshmi, R. Agarwal and C. Agarwal (2004). "Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3." *Int J Cancer* **108**(5): 733-40.
- Sirianni, R., A. Chimento, A. De Luca, I. Casaburi, P. Rizza, A. Onofrio, D. Iacopetta, F. Puoci, S. Ando, M. Maggiolini and V. Pezzi (2010). "Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast

- cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation." *Mol Nutr Food Res* **54**(6): 833-40.
- Smith, R. L. (1999). "Degradative enzymes in osteoarthritis." *Front Biosci* **4**: D704-12.
- Sniekers, Y. H., F. Intema, F. P. Lafeber, G. J. van Osch, J. P. van Leeuwen, H. Weinans and S. C. Mastbergen (2008). "A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models." *BMC Musculoskelet Disord* **9**: 20.
- Souquet, J. M., B. Labarbe, C. Le Guerneve, V. Cheynier and M. Moutounet (2000). "Phenolic composition of grape stems." *J Agric Food Chem* **48**(4): 1076-80.
- Spector, T. D. and A. J. MacGregor (2004). "Risk factors for osteoarthritis: genetics." *Osteoarthritis Cartilage* **12 Suppl A**: S39-44.
- Stabellini, G., M. De Mattei, C. Calastrini, N. Gagliano, C. Moscheni, M. Pasello, A. Pellati, C. Bellucci and M. Gioia (2003). "Effects of interleukin-1beta on chondroblast viability and extracellular matrix changes in bovine articular cartilage explants." *Biomed Pharmacother* **57**(7): 314-9.
- Stanescu, R., A. Knyszynski, M. P. Muriel and V. Stanescu (1993). "Early lesions of the articular surface in a strain of mice with very high incidence of spontaneous osteoarthritic-like lesions." *J Rheumatol* **20**(1): 102-10.
- Stanton, H., F. M. Rogerson, C. J. East, S. B. Golub, K. E. Lawlor, C. T. Meeker, C. B. Little, K. Last, P. J. Farmer, I. K. Campbell, A. M. Fourie and A. J. Fosang (2005). "ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro." *Nature* **434**(7033): 648-52.
- Stockwell, R. A. (1978). "Chondrocytes." *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **12**: 7-13.
- Stove, J., K. Huch, K. P. Gunther and H. P. Scharf (2000). "Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro." *Pathobiology* **68**(3): 144-9.
- Suarez, M., M. P. Romero, A. Macia, R. M. Valls, S. Fernandez, R. Sola and M. J. Motilva (2009). "Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**(32): 4097-106.
- Suganuma, M., S. Okabe, M. Oniyama, Y. Tada, H. Ito and H. Fujiki (1998). "Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue." *Carcinogenesis* **19**(10): 1771-6.
- Sugimoto, Y. and S. Narumiya (2007). "Prostaglandin E receptors." *J Biol Chem* **282**(16): 11613-7.
- Sun, L., C. Luo and J. Liu (2014). "Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation." *Food Funct* **5**(8): 1909-14.
- Sun, T., Q. Y. Chen, L. J. Wu, X. M. Yao and X. J. Sun (2010). "Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer." *Food Chem Toxicol* **50**(10): 3462-7.
- Swarnakar, S., S. Paul, L. P. Singh and R. J. Reiter (2010). "Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin." *J Pineal Res* **50**(1): 8-20.
- Swezey, R. R., D. E. Aldridge, S. E. LeValley, J. A. Crowell, Y. Hara and C. E. Green (2003). "Absorption, tissue distribution and elimination of 4-[(3)h]-epigallocatechin gallate in beagle dogs." *Int J Toxicol* **22**(3): 187-93.
- Takaishi, H., T. Kimura, S. Dalal, Y. Okada and J. D'Armiento (2008). "Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13." *Curr Pharm Biotechnol* **9**(1): 47-54.
- Takashi, Y. and S. Fukumoto (2015). "[Bone and Nutrition. The relationship between iron and phosphate metabolism]." *Clin Calcium* **25**(7): 1037-42.
- Takeda, R., T. Koike, I. Taniguchi and K. Tanaka (2013). "Double-blind placebo-controlled trial of hydroxytyrosol of *Olea europaea* on pain in gonarthrosis." *Phytomedicine* **20**(10): 861-4.
- Tanamas, S. K., P. Wijethilake, A. E. Wluka, M. L. Davies-Tuck, D. M. Urquhart, Y. Wang and F. M. Cicuttini (2011). "Sex hormones and structural changes in osteoarthritis: a systematic review." *Maturitas* **69**(2): 141-56.

- Tarasoff-Conway, J. M., R. O. Carare, R. S. Osorio, L. Glodzik, T. Butler, E. Fieremans, L. Axel, H. Rusinek, C. Nicholson, B. V. Zlokovic, B. Frangione, K. Blennow, J. Menard, H. Zetterberg, T. Wisniewski and M. J. de Leon (2015). "Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol*.
- Taskiran, D., M. Stefanovic-Racic, H. Georgescu and C. Evans (1994). "Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1." *Biochem Biophys Res Commun* **200**(1): 142-8.
- Tetlow, L. C., D. J. Adlam and D. E. Woolley (2001). "Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes." *Arthritis Rheum* **44**(3): 585-94.
- This, P., T. Lacombe and M. R. Thomas (2006). "Historical origins and genetic diversity of wine grapes." *Trends Genet* **22**(9): 511-9.
- Tiralocche, G., C. Girard, L. Chouinard, J. Sampalis, L. Moquin, M. Ionescu, A. Reiner, A. R. Poole and S. Laverty (2005). "Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis." *Arthritis Rheum* **52**(4): 1118-28.
- Toppets, V., V. Pastoret, V. De Behr, N. Antoine, C. Dessy and A. Gabriel (2004). "Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux." *Ann Med Vet* **148**: 1-13.
- Tourino, S., A. Selga, A. Jimenez, L. Julia, C. Lozano, D. Lizarraga, M. Cascante and J. L. Torres (2005). "Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells." *J Agric Food Chem* **53**(12): 4728-35.
- Towheed, T. E., L. Maxwell, T. P. Anastassiades, B. Shea, J. Houpt, V. Robinson, M. C. Hochberg and G. Wells (2005). "Glucosamine therapy for treating osteoarthritis." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD002946.
- Troeberg, L. and H. Nagase (2012). "Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis." *Biochim Biophys Acta* **1824**(1): 133-45.
- Tutino, V., M. G. Caruso, C. Messa, E. Perri and M. Notarnicola (2012). "Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines." *Anticancer Res* **32**(12): 5371-7.
- Tyyni, A. and J. Karlsson (2000). "Biological treatment of joint cartilage damage." *Scand J Med Sci Sports* **10**(5): 249-65.
- Uchida, K., K. Urabe, K. Naruse, Z. Ogawa, K. Mabuchi and M. Itoman (2009). "Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort." *Exp Anim* **58**(2): 181-7.
- Uebelhart, D. (2008). "Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **16 Suppl 3**: S19-21.
- Ueno, I., N. Nakano and I. Hirono (1983). "Metabolic fate of [¹⁴C] quercetin in the ACI rat." *Jpn J Exp Med* **53**(1): 41-50.
- Urpi-Sarda, M., M. Monagas, N. Khan, R. Llorach, R. M. Lamuela-Raventos, O. Jauregui, R. Estruch, M. Izquierdo-Pulido and C. Andres-Lacueva (2009). "Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J Chromatogr A* **1216**(43): 7258-67.
- Ushiyama, T., T. Chano, K. Inoue and Y. Matsusue (2003). "Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids." *Ann Rheum Dis* **62**(2): 108-12.
- Vane, J. R., Y. S. Bakhle and R. M. Botting (1998). "Cyclooxygenases 1 and 2." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 97-120.
- Vilaplana-Perez, C., D. Aunon, L. A. Garcia-Flores and A. Gil-Izquierdo (2014). "Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS." *Front Nutr* **1**: 18.
- Visioli, F., D. Caruso, E. Plasmati, R. Patelli, N. Mulinacci, A. Romani, G. Galli and C. Galli (2001). "Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma." *Free Radic Res* **34**(3): 301-5.

- Visioli, F. and C. Galli (1998). "The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings." *Nutr Rev* **56**(5 Pt 1): 142-7.
- Vitrac, X., A. Desmouliere, B. Brouillaud, S. Krisa, G. Deffieux, N. Barthe, J. Rosenbaum and J. M. Merillon (2003). "Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration." *Life Sci* **72**(20): 2219-33.
- von der Mark, K., T. Kirsch, A. Nerlich, A. Kuss, G. Weseloh, K. Gluckert and H. Stoss (1992). "Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy." *Arthritis Rheum* **35**(7): 806-11.
- Vuolteenaho, K., T. Moilanen, R. G. Knowles and E. Moilanen (2007). "The role of nitric oxide in osteoarthritis." *Scand J Rheumatol* **36**(4): 247-58.
- Wakitani, S., K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata and M. Yoneda (2002). "Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees." *Osteoarthritis Cartilage* **10**(3): 199-206.
- Wang, S. X., L. Arsenault and E. B. Hunziker (2011). "Stereologic analysis of tibial-plateau cartilage and femoral cancellous bone in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis." *Clin Orthop Relat Res* **469**(10): 2796-805.
- Wang, W., D. Rigueur and K. M. Lyons (2014). "TGFbeta signaling in cartilage development and maintenance." *Birth Defects Res C Embryo Today* **102**(1): 37-51.
- Wang, X., D. Hunter, J. Xu and C. Ding (2015). "Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **23**(1): 22-30.
- Watanabe, K., Y. Oue, Y. Miyamoto, M. Matsuura, Y. Mizuno and S. Ikegawa (2010). "Identification of a quantitative trait locus for spontaneous osteoarthritis in STR/ort mice." *J Orthop Res* **30**(1): 15-20.
- Westacott, C. I., R. M. Atkins, P. A. Dieppe and C. J. Elson (1994). "Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage." *J Rheumatol* **21**(9): 1710-5.
- Westacott, C. I. and M. Sharif (1996). "Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?" *Semin Arthritis Rheum* **25**(4): 254-72.
- Whitehead, T. P., D. Robinson, S. Allaway, J. Syms and A. Hale (1995). "Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum." *Clin Chem* **41**(1): 32-5.
- Witztum, J. L. and D. Steinberg (1991). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." *J Clin Invest* **88**(6): 1785-92.
- Woessner, J. F., Jr. (1973). "Purification of cathepsin D from cartilage and uterus and its action on the protein-polysaccharide complex of cartilage." *J Biol Chem* **248**(5): 1634-42.
- Wollny, T., L. Aiello, D. Di Tommaso, V. Bellavia, D. Rotilio, M. B. Donati, G. De Gaetano and L. Iacoviello (1999). "Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production." *British journal of pharmacology* **127**(3): 747-755.
- Woolf, A. D. and B. Pfleger (2003). "Burden of major musculoskeletal conditions." *Bull World Health Organ* **81**(9): 646-56.
- Wu, J. J., P. E. Woods and D. R. Eyre (1992). "Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding." *J Biol Chem* **267**(32): 23007-14.
- Xia, J., B. Allenbrand and G. Y. Sun (1998). "Dietary supplementation of grape polyphenols and chronic ethanol administration on LDL oxidation and platelet function in rats." *Life Sci* **63**(5): 383-90.
- Xie, Q. W., Y. Kashiwabara and C. Nathan (1994). "Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase." *J Biol Chem* **269**(7): 4705-8.
- Xu, B. and S. K. Chang (2012). "Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines." *Food Chem* **134**(3): 1287-96.

- Yada, T., M. Arai, S. Suzuki and K. Kimata (1992). "Occurrence of collagen and proteoglycan forms of type IX collagen in chick embryo cartilage. Production and characterization of a collagen form-specific antibody." *J Biol Chem* **267**(13): 9391-7.
- Yamakoshi, J., S. Kataoka, T. Koga and T. Ariga (1999). "Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits." *Atherosclerosis* **142**(1): 139-149.
- Zeisel, S. H. (1999). "Regulation of "nutraceuticals"." *Science* **285**(5435): 1853-5.
- Zhang, W., M. Doherty, N. Arden, B. Bannwarth, J. Bijlsma, K. P. Gunther, H. J. Hauselmann, G. Herrero-Beaumont, K. Jordan, P. Kaklamanis, B. Leeb, M. Lequesne, S. Lohmander, B. Mazieres, E. Martin-Mola, K. Pavelka, A. Pendleton, L. Punzi, B. Swoboda, R. Varatojo, G. Verbruggen, I. Zimmermann-Gorska and M. Dougados (2005). "EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT)." *Ann Rheum Dis* **64**(5): 669-81.
- Zhang, W., M. Doherty, B. F. Leeb, L. Alekseeva, N. K. Arden, J. W. Bijlsma, F. Dincer, K. Dziedzic, H. J. Hauselmann, G. Herrero-Beaumont, P. Kaklamanis, S. Lohmander, E. Maheu, E. Martin-Mola, K. Pavelka, L. Punzi, S. Reiter, J. Sautner, J. Smolen, G. Verbruggen and I. Zimmermann-Gorska (2007). "EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT)." *Ann Rheum Dis* **66**(3): 377-88.
- Zhao, B., Y. Ma, Z. Xu, J. Wang, F. Wang, D. Wang, S. Pan, Y. Wu, H. Pan, D. Xu, L. Liu and H. Jiang (2014). "Hydroxytyrosol, a natural molecule from olive oil, suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells via inactivating AKT and nuclear factor-kappa B pathways." *Cancer Lett* **347**(1): 79-87.
- Zhen, G., C. Wen, X. Jia, Y. Li, J. L. Crane, S. C. Mears, F. B. Askin, F. J. Frassica, W. Chang, J. Yao, J. A. Carrino, A. Cosgarea, D. Artemov, Q. Chen, Z. Zhao, X. Zhou, L. Riley, P. Sponseller, M. Wan, W. W. Lu and X. Cao (2013). "Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis." *Nat Med* **19**(6): 704-12.
- Zhou, X., W. Li, L. Jiang, J. Bao, L. Tao, F. Li and L. Wu (2013). "Tetrandrine Inhibits the Wnt/ β -Catenin Signalling Pathway and Alleviates Osteoarthritis: An In Vitro and In Vivo Study." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**.
- Zujko, M. E., A. M. Witkowska, A. Waskiewicz and E. Sygnowska (2012). "Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population." *Adv Med Sci* **57**(2): 375-84.

Thèse de Doctorat

Elsa MÉVEL

Utilisation des procyanidines et de l'hydroxytyrosol dans la
prévention de l'arthrose
Use of procyanidin and hydroxytyrosol in osteoarthritis prevention

Résumé

L'arthrose est une pathologie qui affecte une part grandissante de la population. Actuellement, parmi les différentes solutions thérapeutiques existantes, aucune ne permet de traiter l'origine de la maladie. Les mécanismes conduisant à l'inflammation et à la dégradation du cartilage sont aujourd'hui de mieux en mieux connus et laissent envisager une prise en charge étiologique, et non plus uniquement symptomatique. Il semble que l'utilisation de nutraceutiques en prévention de l'arthrose offre aujourd'hui une stratégie prometteuse. Notre travail s'est focalisé sur le développement d'une stratégie préventive de l'arthrose basée sur l'utilisation d'hydroxytyrosol et/ou de procyanidines issus d'extraits d'olives et de raisins par une approche translationnelle. Nous avons pu démontrer que ces molécules ont un effet protecteur sur la production de marqueurs inflammatoires et cataboliques induits par un traitement à l'IL-1 β dans des chondrocytes isolés ainsi que dans des explants de cartilage. Notre travail a aussi montré que les extraits sont biodisponibles dans le sérum après administration orale et conservent leurs effets chondroprotecteurs chez le lapin et le chien. Notre étude a enfin souligné une prévention nutritionnelle avec l'hydroxytyrosol et/ou des procyanidines de la sévérité de l'arthrose induite par chirurgie chez la souris et le lapin. L'ensemble de ces résultats offrent une alternative prometteuse dans la prévention de l'arthrose par des nutraceutiques.

Mots clés

Arthrose, cartilage, inflammation, chondrocytes, polyphénols, hydroxytyrosol, procyanidines

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a major health concern that affects a growing part of the aging population. Nowadays, among different existing therapeutic strategies, none of them is able to treat the origin of the disease. The mechanisms leading to inflammation and cartilage breakdown are well understood and allow defining an etiologic and not only symptomatic patient care. The nutraceutical use in prevention of OA seems to be an interesting strategy. In this way, our study was focused on the development of preventive strategy of OA by using hydroxytyrosol and/or procyanidines which were extracted from olive and grape for a translational approach. We showed that these molecules had a protective effect on the production of inflammatory and catabolic markers on l'IL-1 β treatment on freshly isolated cells and in cartilage explants. Our work has also demonstrated that the extracts are bioavailable after oral administration and conserved their chondroprotective effect in rabbit and dog. Finally, our study underlined a nutritional prevention with hydroxytyrosol and/or procyanidines on surgically induced osteoarthritis in mice and rabbit. Altogether, these results offered promising alternatives in the design of new strategy in nutraceutical management of OA.

Key Words

Osteoarthritis, cartilage, inflammation,
chondrocytes, polyphenols, hydroxytyrosol,
procyanidines